酶的结构和功能

〔英〕C. H. 温 著

.17435
33

科学出版社

58.17435
583

酶的结构和功能

〔英〕C. H. 温 著

罗 兰 译 李文杰 校

科学出版社

1 9 8 3

中国科学院植物研究所图书室藏

中科院植物所图书馆
S0011921

23283

内 容 简 介

本书在化学和物理学的基础上讨论生命现象所发生的各种反应的性质，以及这些反应的催化作用。书中结合近几年的新进展，对酶的各方面基础知识作了系统的介绍。书中未作深奥理论的探讨及繁杂的数学计算。

全书文字较流畅、内容新颖、浅显易懂，可供大专院校生物、医药、农林等专业师生，生物学工作者及中学生物教师参考。

Colin H. Wynn

THE STRUCTURE AND FUNCTION OF ENZYMES

Edward Arnold 1976

酶的结构和功能

〔英〕C. H. 温 著

罗 兰 译 李文杰 校

责任编辑 高小琪

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1983年3月第一版 开本：787×1092 1/32

1983年3月第一次印刷 印张：2 7/8

印数：0001—7,750 字数：53,000

统一书号：13031·2191

本社书号：2997·13—10

定价： 0.48 元

总　　序

在编写单一教科书时，由于缺乏足够的最新材料致使其包括生物学整个领域是不再可能的。为此，生物研究所主持编辑了这套小丛书，以便教师和学生能够学习本学科有关重要进展。本丛书受到的热情欢迎，表明了这套书在生物学课题的很多论点上是具有权威性的。

本丛书的特点是注意了研究方法，并精选了书目，以便读者深入探讨和尽可能为实际工作提出建议。

本研究所主管教育负责人欢迎读者的批评意见。

生物研究所

1979　伦敦

序　　言

用化学和物理学的术语来解释所有生物学现象的雄心并非异想天开。这本小册子就打算把生物学中所发生的反应的本质以及这些反应的催化作用放在这个基础上加以讨论。已对不少酶作过详尽的研究，并已尝试把酶的结构与催化机制联系起来。虽然近年来我们对酶的催化作用机制了解得更深入了，并且有可能在某些系统中建立结构和功能之间的相互关系，但我仍希望这本小册子能对从事这个领域研究的人起到促进作用。有关这方面任何研究工作的最终目标必定都会对细胞作出完整的化学阐述。

C. H. 温

1973　曼彻斯特

目　录

1 酶——化学催化剂……1
1.1 催化作用需要酶……1
1.2 核糖核酸及酸、碱对它的水解作用……3
1.3 核糖核酸酶及其作用机制……5
1.4 结构和生物学功能……6
2. 蛋白质结构……9
2.1 酶是蛋白质……9
2.2 氨基酸的性质和多样性……10
2.3 一级结构——肽键和氨基酸的顺序……13
2.4 活性中心概念……16
2.5 二硫桥……18
2.6 二级结构：α-螺旋，β-折叠片和氢键……19
2.7 氨基酸和蛋白质的电离作用……24
2.8 三级结构……26
2.9 四级结构……29
3. 命名法、辅酶和酶学方法……31
3.1 命名法……31
3.2 辅酶……32
3.3 酶的分类和编号……38
3.4 酶活力的测定……39
3.5 一级顺序的测定……42

3.6 活性中心的测定 …………………………………………… 48
3.7 大小和形状的测定 …………………………………………… 50
4. 影响酶活力的因素 …………………………………………… 55
4.1 酶-底物复合体的形成 …………………………………………… 55
4.2 酶浓度 …………………………………………… 58
4.3 时间 …………………………………………… 59
4.4 底物浓度 …………………………………………… 60
4.5 V 和 K_m 的测定及其意义 …………………………………………… 62
4.6 pH …………………………………………… 64
4.7 温度和变性作用 …………………………………………… 65
4.8 不可逆和可逆的抑制剂 …………………………………………… 68
5. 酶的分子结构 …………………………………………… 72
5.1 酶作用机制 …………………………………………… 72
5.2 四级结构、蛋白质亚单位和别构效应 …………………………………………… 76
5.3 乳糖合成酶 …………………………………………… 79
5.4 反馈抑制作用和代谢的控制 …………………………………………… 81
5.5 代谢的激素控制——糖原的裂解 …………………………………………… 82
5.6 酶的细胞组织机构及多酶系统 …………………………………………… 83

1. 酶——化学催化剂

1.1 催化作用需要酶

在活细胞中发生的无数化学反应的一个共同特点就是，这些反应的速度大大快于那些非生命环境中所发生的类似反应。其中最突出的一个例子就是肌肉收缩。当肌肉发生收缩时，利用了大量的能量，而且还必须是在极短的时间内利用这些能量。要解释活细胞中这种反应速度的加快现象，就必然会想到反应中存在催化剂。催化剂广泛应用于工业生产过程，对它们的特性已做过多方面的深入研究。对于来源于生物的特殊形式的催化剂，采用“酶”这个术语来表示，也就是“在酵母中”的意思，用酶这个词也历史地反映出我们对酶的性质方面的许多知识是通过对酵母及其他微生物的研究取得的。因此，酶被定义为可以加快特异的反应速度（尽管它不影响反应最终建立的平衡状态），及在反应终止后还能从反应混合物中回收的生物来源的分子。

酶的另一个基本特点就是它们自身的浓度也可以影响反应速度，所以我们可以这样认为，通过改变酶的浓度就可以巧妙地控制代谢反应进行的程度。除了利用酶浓度能进行这类控制外，酶本身的催化活力也易受控制。在这种情况下，虽然酶浓度不变，但酶影响一种特殊反应的能力却可能起了变化

了。在肌肉收缩和舒张时，虽然肌肉中的酶组成基本上是相同的，然而处在这两种肌肉活动状态时，所进行的各种反应过程却是很不相同的。

从最早有记载的时候起，人们就已经在酒精生产和干酪制造中利用了酶的性质。起初这种利用纯属偶然，并难以控制。但随着时间的进展，很可能人们开始了解到温度及其他一些因素能影响这个所谓的发酵过程，并无意识地记录下了生物化学中的这第一步。以后一个时期进展缓慢，直到十八世纪末期和十九世纪初期，才着手对发酵过程做了许多详细的研究。这一时期的主要贡献属于施旺（Schwann）和巴斯德（Pasteur）的工作，施旺认识到酵母是一种能把糖转化成酒精和二氧化碳的植物，巴斯德研究了氧气对发酵过程的影响，并分析了许多不同发酵过程的最终产物。不幸的是，在这个时期进一步的研究受到广泛流传的生机论（Vitalism）的阻碍。生机论认为有机化合物的合成必须有生命力，而且这种生命力只存在于活的有机体中。最后布许纳（Buchner）证明，利用已除去活酵母的酵母提取液可以使糖发酵，从而为详细研究酶的化学和物理特性铺平了道路。

早在二十世纪初就已分离出了发酵过程所涉及的个别酶，并发现了从糖生产酒精时所形成的中间化合物。近 20 年来，在代谢途径及酶的作用的知识方面出现了令人瞠目的进展。已搞清了控制反应所必须的条件及反应进行的方式。由于现代技术的进展以及排除了生机论的观念，才有可能取得这些进展。发生在活细胞内的所有过程都能够通过物理学的

定律得到解释的这一信念，已因所取得的快速进展获得成功，而生机论的看法则阻碍了科学实验的进行。

对于一个已知反应，将未受催化反应的机制与已知的受催化反应的机制相比较的研究方法是可取的。用这种方法我们将能了解催化作用真正的本质及其控制。

1.2 核糖核酸及酸、碱对它的水解作用

在细胞的生长中，核糖核酸（一般缩写成 RNA）是一种具

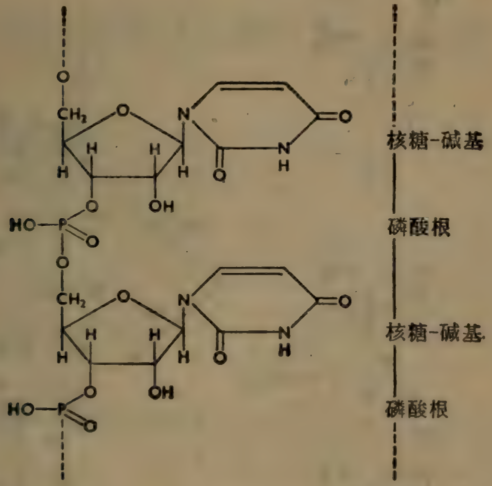


图 1-1 显示键合性质，也概括组成部分相对位置的核糖核酸分子（RNA）的一个节段。虽然在正常的 RNA 分子中还具有另外三种碱基，即腺嘌呤、鸟嘌呤与胸腺嘧啶，但在本例中只显示了一种碱基，即尿嘧啶。

有生物学重要性的大分子，因为它的许多功能之一是把存在于核内的遗传信息带到细胞质中去，在那里遗传信息被转译成专一的蛋白质。图 1-1 示出了 RNA 分子的一个节段的主要特征，并概括了结构上的主要特征。

在相当严格的条件下用酸或碱来处理 RNA，其分子即被完全水解，并产生成克分子比例的磷酸盐、核糖和杂环碱基的

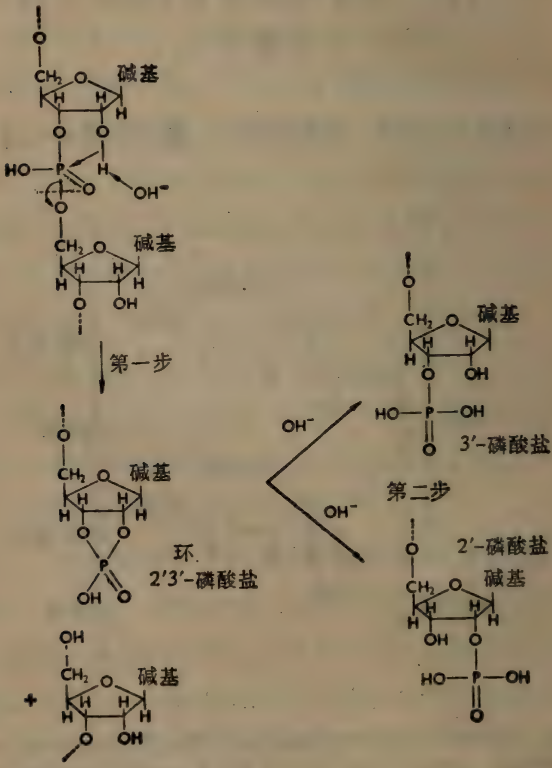


图 1-2　RNA 的温和碱性水解的机制。

混合物。然而，RNA 在温和情况下水解时，例如在室温下用 0.01 *M* 的氢氧化钠水解时，则可检定出各种较大的不同片段。详细研究碱对 RNA 的作用机制是很有趣的。此作用机制的第一阶段是 OH^- 离子的亲核性攻击作用（如图 1-2 中的箭头所示），形成的第一个产物是环 2′, 3′-磷酸盐（因核糖环上 2、3 位置被酯化而得名）。环磷酸盐只是这个反应的一个中间产物，OH^- 离子进一步的攻击，相当容易地就切断 C—O—P 键，因而产生 2′-和 3′-磷酸盐的混合物。从这些反应可以看出，在温和的碱性水解作用情况下，RNA 的裂解是在局部受控的方式下经过几步完成的。

1.3 核糖核酸酶及其作用机制

生命系统总是处于动态平衡状态，这是它的基本特征。就是说，组成细胞的化学骨架的分子，总是在不断地进行合成和降解。核糖核酸也不例外，所有细胞都存在水解核糖核酸的酶，即核糖核酸酶。已广泛研究了这些酶的化学结构及物理特性，通过这些研究出现了各种阐述所催化的反应机制的理论。

已经证明，牛胰核糖核酸酶分两步水解 RNA 的方式与碱的作用方式多少有点相似。第一步产生环磷酸盐，随后一步再从 3′- 磷酸处断裂。也许有人会把这种作用简单地认为是由于有 OH^- 离子存在的缘故，其实应该注意到，酶是在近似中性 pH 的缓冲液中作用的，其中 OH^- 离子的浓度是非常小

的。

图 1-3 示出了核糖核酸酶作用的可能方式。这个酶至少有两个可电离的基团，这些基团参与了催化活性，它们组成称为酶的“活性中心”的一部分。在反应的第一步中，基团 A 作为质子受体，其作用与 OH^- 离子的基本特性相同，而基团 B 则作为质子供体，也即起酸的作用。反应的第二步，基团 A 又成了质子供体，而 B 成为质子受体。在一系列反应完成以后，酶仍处于它的初始状态，并且又准备去完成水解另一个 P—O 键的催化作用。

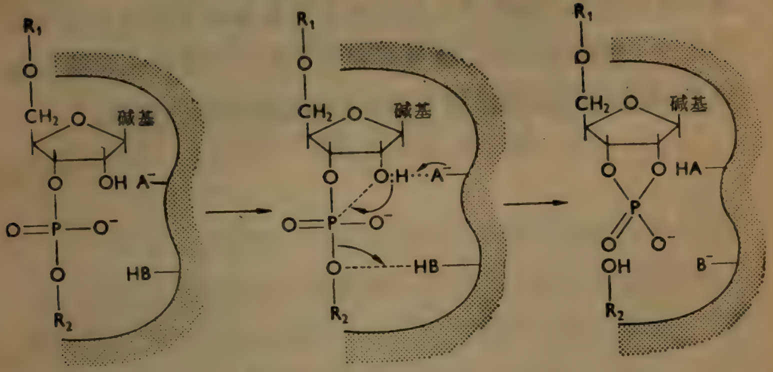
从某种意义上讲，酶集中了酸、碱二者的水解作用，因而比二者更有效。当然，想设计一种既含酸又含碱的常规性非生物系统的催化剂是不可能的，因为酸和碱会发生中和作用。活性中心这两种可电离基团的存在，使酶得以发挥它特殊的水解作用。

1.4 结构和生物学功能

胰核糖核酸酶作用机制的例子说明，一个酶的作用有一种逻辑性的和严格的化学解释。人们发现对所有已经详细研究过其作用方式的酶来说，这种解释都是适用的，没有理由怀疑它的普遍适用性。

在图 1-3 所示的反应图解中可见，基团 A 与基团 B 在空间是这样排列，以便与正在被水解的 RNA 中的键紧密靠近。作为大分子的一部分的基团，不能象 OH^- 离子那样可以自由

1. 环磷酸盐的形成



2. 水解作用

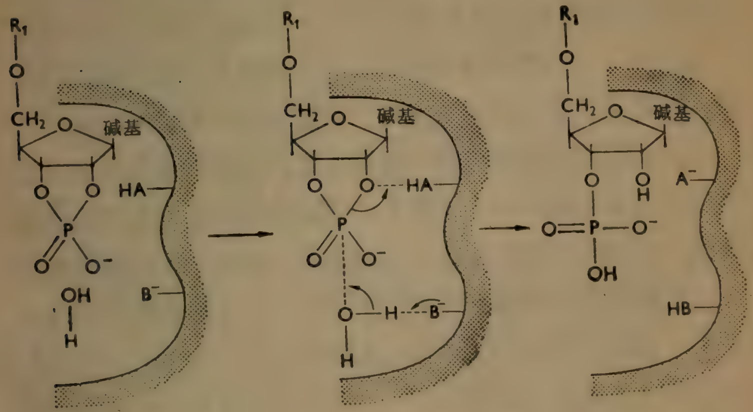


图 1-3 胰核糖核酸酶对 RNA 作用的可能机制。阴影部分表示带有A和B两个催化基团的酶。图中只给出了 RNA 分子的一个重复序列，R_1 和 R_2 代表分子的其余部分。

扩散到整个 RNA 溶液，因此它就依靠基团彼此间以及与 RNA 分子间形成正确的空间排列，而这个 RNA 分子则必须是以某种方式与酶键合。酶的活力是依靠分子的三维结构。要充分了解酶的作用，就有必要先了解一下各种化学键和物理力，在它们的共同作用下能给予酶以结构和稳定性。

2. 蛋白质结构

2.1 酶是蛋白质

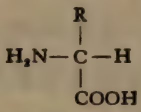
一详细分析酶的化学结构就会认识到所有的酶都是蛋白质。目前已发现了一千多种酶，并对其中的许多做过全面鉴定，尚无证据可怀疑酶和蛋白质是等同的这种正确性。在有些例子中，酶分子具有附带的特征，象金属离子或碳水化合物以及其他一些小的有机分子，可是，尽管这些非蛋白性物质可能对酶的催化活力起到一定的作用，有时还可能起主要作用，但酶的基本催化功能通常还是依靠蛋白质部分。

反过来说蛋白质就是酶，那么对某些显然不具有催化活力的蛋白质来讲就不对了。骨骼、皮肤和腱的主要蛋白——胶原蛋白就是这种蛋白质的一个例子。在身体中胶原蛋白似乎是起结构上的作用，不能指望它会参加总称为新陈代谢的降解和合成过程。另一个不是代谢活性蛋白而是结构蛋白的例子就是角蛋白，角蛋白组成了身体外表面的一部分，如头发、指甲、角以及皮肤的最外层——表皮层。发挥另一种功能的蛋白质叫做 γ-球蛋白。这种蛋白质是抗体，它提供了部分身体防御的机制，以抵抗疾病和所有外来物质的入侵。尚未证明 γ-球蛋白具有任何催化活力。

要想完全了解酶的性质，就必须知道蛋白质的详细结构。蛋白质是氨基酸的多聚体，蛋白质中通常具有 20 种氨基酸。依靠这些相对数量比较少的基本组成单位，至少可以形成一千种不同的蛋白质。而且对酶的结构来说，显然每一种氨基酸的性质和数量以及它在蛋白质多聚体内的排列都是至关重要的。因此我们必须首先了解氨基酸的性质和种类。

2.2 氨基酸的性质和多样性

氨基酸含有氨基和羧基两种基团，所以显示出酸和碱两种性质。它们的结构可以用一通式来表示，即：



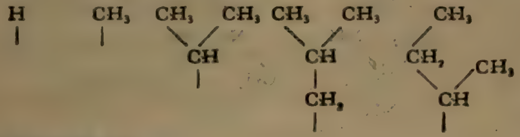
式中 R 对各种不同的氨基酸是不同的。除了最简单的氨基酸——甘氨酸中的 R 是氢以外，中心碳原子是与四种不同的基团相键合，因此使分子产生不对称现象，具有旋转偏振光平面的能力，即具有旋光性。蛋白质也显示旋光活力，这既是由于它们的组成氨基酸所造成的，也是由于在聚合的分子中因氨基酸键合而产生的更加不对称的现象所造成的。这种性质可以部分说明在它们将要催化的反应中所表现出的严格的选择性以及所形成产物的精确性。

在本章的后面我们将会看到，在氨基酸形成蛋白质的聚

表1　按其侧链(R)的性质对氨基酸的分类

(1)　非极性脂肪族基团

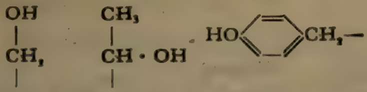
甘氨酸 (Gly)　丙氨酸 (Ala)　缬氨酸 (Val)　亮氨酸 (Leu)　异亮氨酸 (Ile)



惰性的和疏水的

(2)　含有羟基的脂肪族和芳香族基团

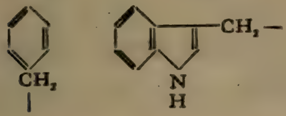
丝氨酸 (Ser)　苏氨酸 (Thr)　酪氨酸 (Tyr)



脂肪族是中性的，但酪氨酸是弱酸性的。
疏水性小于非极性脂肪族氨基酸。

(3)　芳香族类

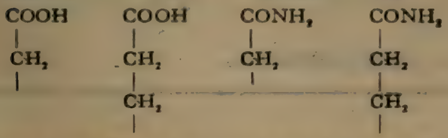
苯丙氨酸 (Phe)　色氨酸 (Try)



酪氨酸也是芳香族，但适合归于其他含羟基的氨基酸中。疏水的。

(4)　酸性的

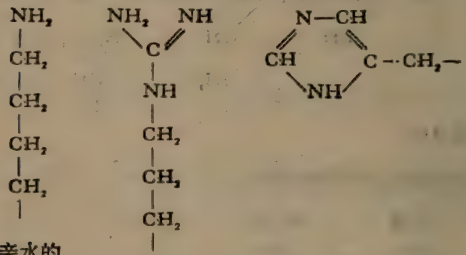
天冬氨酸 (Asp)　谷氨酸 (Glu)　天冬酰胺 (Asn)　谷氨酰胺 (Gln)



天冬酰胺和谷氨酰胺是分别从天冬氨酸和谷氨酸衍生出来的酰胺。亲水的。

(5) 碱性基团

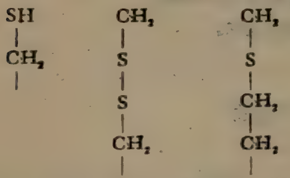
赖氨酸 (Lys)　　精氨酸 (Arg)　　组氨酸 (His)



亲水的

(6) 含硫基团

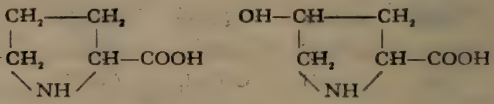
半胱氨酸 (Cys)　　胱氨酸 (Cys-Cys)　　甲硫氨酸 (Met)



半胱氨酸是弱亲水的，而甲硫氨酸是疏水的。胱氨酸是两个半胱氨酸残基以 S — S 键结合形成的。

(7) 亚氨基基团

脯氨酸 (Pro)　　羟脯氨酸 (Hyp)



这类示出的是完整的氨基酸的结构。

合作用中会涉及到氨基和羧基。因此对蛋白质催化活力贡献最多的是R的性质，而R的多样性可使被催化的反应的变化中具有多样性。把各种R基团分成七大类是合适的(表1)。其中第七类不是真正的氨基酸，因为这类中的氨基不是游离的，而是成为一种环状结构的一部分。后面我们就会看到R的这些不同导致了蛋白质结构上的重要改变。各类R基团的后面概述了该基团的重要物理性质。特别着重基团与水的相互作用。根据这一点，就可能把这些基团粗略地分为两种类型：

1. 亲水的——又称“喜水的”　这些基团具有易溶于水的特性。酸性的和碱性的基团是非常亲水的。

2. 疏水的或“憎水的”　这些基团难溶于水及其他极性溶剂(如乙醇)，但由于基团中碳氢化合物的性质而易溶于乙醚、苯和类似的非极性溶剂中。

2.3 一级结构——肽键和氨基酸的顺序

一个氨基酸分子的羧基与另一个氨基酸分子的氨基之间脱掉水，就形成一种相似于酰胺中见到的那种类型的键合，在这里称作肽键：

$$H_2N\cdot\overset{\overset{R_1}{|}}{C}H\cdot COOH + H_2N\cdot\overset{\overset{R_2}{|}}{C}H\cdot COOH \longrightarrow H_2N\cdot\overset{\overset{R_1}{|}}{C}H\cdot CO\cdot NH\cdot\overset{\overset{R_2}{|}}{C}H\cdot COOH + H_2O$$

式中R_1-和R_2表示相同的或不相同的替换基。上述反应

形成的分子称作二肽。因为这个氨基酸是双功能性的（即含有一个氨基和一个羧基），所以这个过程可以持续进行下去，以致形成三肽、四肽等等。许多氨基酸缩合后形成的产物就是我们所称的多肽。多肽和蛋白质之间的确切区别还不清楚。不过大多数蛋白质至少有100个氨基酸结合在一起（一般用氨基酸残基来表示），并且蛋白质具有明确的高级结构。另一方面，多肽这个词一般限于指含有20个氨基酸残基、缺乏高级结构的分子。每一个多聚分子只有一个自由α-氨基和一个自由α-羧基。因此对蛋白质分子的性质说来，这两个基团的性质只起小部分作用，绝大部分取决于R基的性质。从表中可以看到，有些氨基酸含有另外的氨基和羧基，这些基团当然是自由的，并对蛋白质的性质起着一定的作用。

虽然上述方程式足以说明形成肽键的化学过程，但不能反映出这些键的三维定向的概念。图2-1显示两个α-碳原子介入的C、O、N、H原子全部位于同一平面上，因为联结这些原子的键之间的角度相加可达360°。只有在α-碳原子周围有4个不同的基团与它相连时，才能够发生自由旋转。肽中C—N键的部分双键性质可以部分地解释这一点。键的长度比在氨基酸中的C—N键长度要短也可以证明这一点。从图中还可以看到R基团是沿着肽的主链以一种反式的构型排列的。

氨基酸连接在一起的次序称作蛋白质的一级顺序，这种顺序与肽键的结构一起组成了所谓的蛋白质的一级结构。已经测定过很多蛋白质中氨基酸的顺序。从羊身上分离出来的

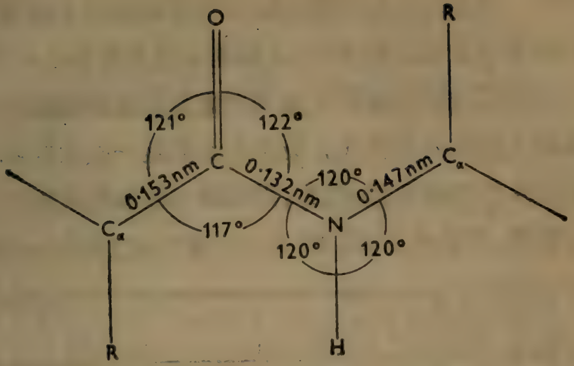


图 2-1　肽键的几何学（nm ＝　毫微米)。

促肾上腺皮质激素的全部结构是：

丝·酪·丝·甲硫·谷·组·苯丙·精·色·甘·
赖·脯·缬·甘·赖·赖·精·精·脯·缬·赖·
缬·色·脯·丙·甘·谷·天冬·天冬·谷·丙·
丝·谷·丙·苯丙·脯·亮·谷·苯丙

通常用氨基酸缩写字来记录蛋白质或多肽的顺序，并且习惯上是从 N- 末端开始顺序记录的，即从具有自由 α- 氨基的那一端开始。

如果同是 39 个氨基酸，但按不同的顺序连接在一起，那将会怎样呢？一般来讲这个分子将失去生物活力。因此，对一个特殊的蛋白质来说，氨基酸的性质和顺序通常是专一的。当人们研究了不同物种的具有相同功能的蛋白质后，发现这些蛋白质的性质和顺序稍有变化。以促肾上腺皮质激素为例，对已研究的所有物种而言，其中 1—24 及 33—39 残基看来是

不变的，然而当比较了猪、人、牛与羊的促肾上腺皮质激素的一级顺序后发现，在25—32残基上显然有较小的变化(如下表)。我们把与猪的促肾上腺皮质激素的氨基酸顺序不一致的氨基酸下面划一条黑线。最常改变的是一些次要性的以及具有相似性质的氨基酸。因此，丙氨酸可以取代性质与它很相似的甘氨酸，谷氨酸可以取代另一个酸性氨基酸——天冬氨酸。

	25	26	27	28	29	30	31	32	33
猪	天冬	甘	丙	谷	天冬	谷氨酰胺	亮	丙	谷
人	天冬	丙	甘	谷	天冬	谷氨酰胺	丝*	丙	谷
牛	天冬	甘	谷	丙	谷	天冬	丝	丙	谷氨酰胺*
羊	丙	甘	谷	天冬	天冬	谷	丙	丝	谷氨酰胺*

*原书中未加横线，似有误。——译者注

2.4 活性中心概念

现在已经很明确，在一种蛋白质分子中只有少数几个专一的氨基酸残基与蛋白质的功能直接有关。在酶中，这些专一的残基与酶分子的催化活力有关。其他氨基酸残基则协助形成并稳定分子的三维结构(下一章就会讲到)。在促肾上腺皮质激素中，1—24及33—39之间的残基可能是与激素的功能有关，而25—32之间的可变残基则帮助维持分子的总的形状。它们也可能涉及到维持物种的特征，每个物种靠了这种

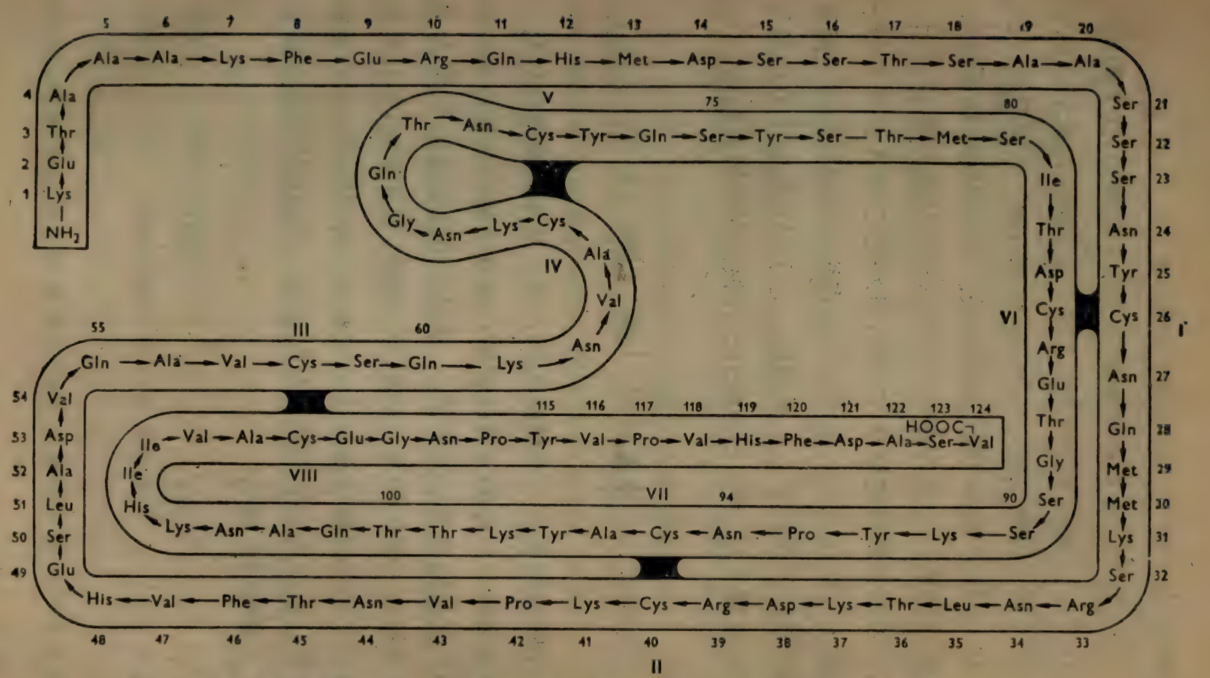


图 2-2　牛胰核糖核酸酶 A 的一级顺序。组氨酸 12 和 119 以及赖氨酸 7 和 41 组成了活性中心部分。

特征就能够识别与它同种的蛋白质分子。

图2-2显示了核糖核酸酶蛋白质的一级结构，这个酶第一章已介绍过。核糖核酸酶含有124个氨基酸，并显示出在12和119位置上的组氨酸（写作His 12和119）与赖氨酸（Lys 7和41）一起与实际的催化反应有关。可是如图中结构所示，这些残基却被远远地分开了。但在活性的核糖核酸分子中，它们必须相当紧密地结合在一起，因为是在RNA分子中的一个单键上发生作用的。构成分子的直接功能部分的这一组氨基酸残基称为活性中心。很明显，为了把直线顺序中相距很远的残基聚集在一起，蛋白质分子在该处必须折叠起来。

2.5 二 硫 桥

半胱氨酸含有一个硫醇基团，这个基团易被氧化成两个硫原子连接在一起的二硫化合物。这种二硫桥容易在蛋白质中的半胱氨酸残基之间形成。这种键可起到把两个蛋白质分子连接在一起的作用，或者，如果蛋白质分子大，并且至少含有两个半胱氨酸残基的话，这种键可起到把同一个分子的两个部分联结起来的作用，从而造成一种结构中的永久性折叠。二硫桥的结构是：

$$
\begin{array}{ccccccccc}
| & & & & & & & & | \\
NH & & & & & & & & NH \\
| & & & & & & & & | \\
CH & - & CH_2 & - & S - S & - & CH_2 & - & CH \\
| & & & & & & & & | \\
CO & & & & & & & & CO
\end{array}
$$

从图2-2可以看到核糖核酸酶含有4个这样的二硫键，包含

了8个半胱氨酸残基。这些二硫键限制了核糖核酸酶中残基的自由旋转，并导致链的折叠。不过这还不足以说明活性中心的各种基团是怎样聚合在一起的。只有在讨论蛋白质的二级和三级结构时才有可能作出充分的说明。

2.6 二级结构：α-螺旋，β-折叠片和氢键

二级结构这个术语是描述由于多肽主链上的羰基氧原子和酰胺的氮原子之间形成氢键，而使不易于弯曲的肽链折叠。必须着重指出的是，这是一种特殊类型的结构，只包括主链中各原子之间的氢键结合。侧链氨基酸残基中原子之间的氢键结合对二级结构不起作用，但正如我们后面将讨论到的那样，侧链氢键结合对确定三级结构却是非常重要的。

氢键（大约具有16.74千焦耳/克分子的能量）与共价键C—H（具有364千焦耳/克分子能量）相比，是一种非常弱的键。然而，如果一个分子中有足够的氢键，就会使结构相当稳定。氢键以及它对一种分子的物理性质的效应最好在水中来考虑。在水中，共价键 O—H 的电子在原子之间并不是等同地共享的，而是被拉向氧原子一方，因此使键具有极性的特性。这点可以用在氧原子上偏负电荷、氢原子上偏正电荷来说明。这种偏电荷引起了各个水分子之间的静电相互作用，如图2-3所示。因为氧的最外层有6个电子，在水分子中键合只用去其中两个电子，其余的电子就有给予缺电子的氢原子的趋势。虽然这样并不能达到完满的键的形成，但它有助

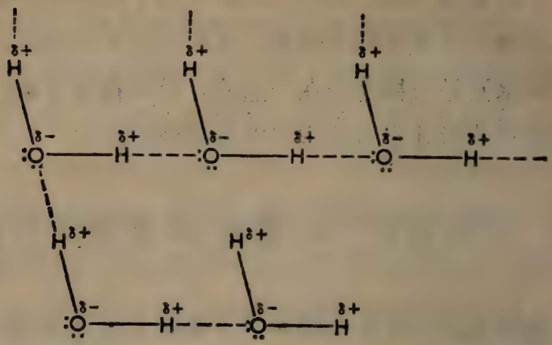


图 2-3　液态水的结构。虚线代表氢键。

于解说氢键的强度。所有这些效应说明，不能把水作为 H_2O 分子来考虑，而必须认为它是这些分子的松散结合。从氧在周期表中的位置来看，可以预计在室温下水应该是一种气体（象 H_2S 就是气体）。但由于水分子以氢键的方式结合，就使得在室温下水表现出液体的性质。

不仅是在 O—H 键中的氢原子才可以形成氢键。当氢与不相似的原子键合，并且由于电子吸引作用该原子在键上产生一种极性的情况下，也可以发生氢键。在蛋白质中最重要的氢键有：—N—H⋯O— 和 —N—H⋯N—，这里虚线即代表氢键。已证明，当 N、H 和 O 或 N 原子处于一条直线上时，氢键就最稳定。

可把由于多肽主链不同部位之间的氢键结合而产生的二级结构分成两大类：α- 螺旋和 β- 折叠片。α- 螺旋首先是鲍林（Pauling）和科里（Corey）根据理论研究设想出来的。他们论证说，蛋白质分子最稳定的折叠必须至少满足四个基本

准则:

(1) 绝大部分的氢键应是在肽主链的 CO 基团和 NH 基团之间形成。

(2) 肽键应象图 2-1 那样在一个平面上。

(3) 氢键的 O、H 和 N 原子应该在一条直线上。

(4) 如沿着结构移动,原子应具有一种恒定的空间级数,即在直线方向上 C、N 和 O 原子应以有规律的间隔重复。

图 2-4 表示蛋白质分子为满足这些准则而形成的螺旋结

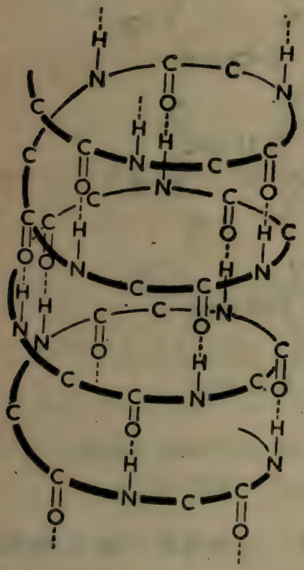


图 2-4 α-螺旋依靠链内氢键结合显示出结构的稳定。

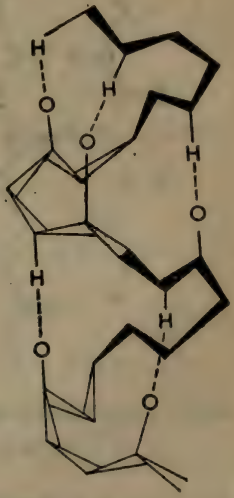


图 2-5 显示肽键平面结构的 α- 螺旋。为了清楚明了,个别原子已略去。

构。这个结构称之为 α- 螺旋,它有几个重要特点。每一螺圈有 3.6 个氨基酸残基,导致每 5 个螺圈有一重复的类型。螺

旋的角度是 26°，螺距为 0.54 毫微米 (nm)。这个结构以后通过蛋白质晶体的 X 射线结晶学分析（后面要讨论的一种技术）得到证实。为了强调肽键的平面性结构，图 2-5 给出 α-螺旋的图解表述，为了清楚明了，图中略去了个别原子。亚氨基酸、脯氨酸和羟脯氨酸无法容纳在 α- 螺旋结构中，因此这个有规则的结构在蛋白质链出现这些亚氨基酸的区域断开。

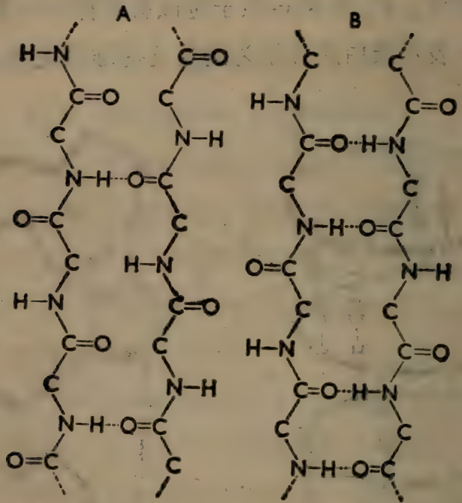


图 2-6　A：同向平行的 β-折叠片。B：逆向平行的 β-折叠片. 为了清楚起见，C_α 上的 R 取代基被略去。

图 2-6 示出 β-折叠片中的氢键。这种结构可能有两种形式。一种是多肽的片段可能被聚在一起，以致两条链是平行的，并且当按 α- 碳原子、羰基、NH 基团的方向顺序表示时，两条链的走向相同。这种结构称作同向平行的 β-折叠片。另一种是两条链虽然平行，但走向相反。这一类型的二

级结构叫做逆向平行 β-折叠片。有时，折叠片结构被用来连接不同多肽分子的相邻近的链。这种情况在象蚕丝中的丝心蛋白以及毛发中的角蛋白等纤维结构中都是常见的。图 2-7 再次着重说明肽键的平面性质，并表明打折的结构如何能够建立起一个巨大的三维排列。

图 2-7 β-折叠片的三维网络(表明与纸平面垂直的肽键的平面性)。

尽管许多蛋白质显示具有这些结构中的一种或两种，但决不是所有肽的主链都按这种有规则的方式来排列。有些蛋白质可以含有多至 80% 的规则结构，而另一些则可能只含有象 20% 这样低的规则结构。常常是由于大量的肽主链表现出无规则的折叠，而使少部分的螺旋卷曲看上去是彼此分开的。事实上，这种外观上的无规则性正是由于分子的三级结构所产生的一种有规则的结构。控制三级结构构型之间的力是静电力。我们即将讨论氨基酸残基侧链之间的这种静电力的来源。

2.7 氨基酸和蛋白质的电离作用

一种酸电离产生质子的趋势取决于溶液中质子的浓度。因此，如果人们研究弱酸（如乙酸）的电离作用，那么反应就会按下列方程式建立平衡：

$$CH_3COOH + H_2O \rightleftharpoons CH_3COO_3^- + H_3O^+$$

在低 pH 值时（如溶于浓无机酸的乙酸溶液），溶剂化的质子浓度非常高，电离作用可以忽略。反之在高 pH 值时（如将乙酸溶于某些碱性溶液），溶剂化的质子浓度则非常低，这时电离作用实际上是完全的。在某些中间 pH 值时，平衡的位置是在电离的和未电离的乙酸浓度相等处。这个 pH 值叫做电离形式的 pK 值。因此乙酸的 pH 值是 4.7。

羧基决不是在氨基和蛋白质中的唯一的电离基团。在低 pH 值时，氨基能够接受一个质子，这个过程可用下列方程式表示：

$$R \cdot NH_3^+ + H_2O \rightleftharpoons R \cdot NH_2 + H_3O^+$$

在简单的脂肪族胺——甲胺中的情况是，在 pH 10.7 时，反应处于平衡，这时电离的和未电离的甲胺浓度相等。因此甲胺的 pK 值就是 10.7。

表 2 概括了氨基酸和蛋白质中重要基团的电离作用，并给出这些电离基团 pK 值的可能范围。任何特定基团的 pK 值在很大程度上都取决于分子的其他部分。虽然乙酸的 pK 值是 4.7，但甘氨酸中羧基的 pK 值是 2.34。同样，氨基电离

表 2 氨基酸和蛋白质中的可电离基团

基　　团	平　　衡	pK 值的可能范围
α-羧基	$-COOH \rightleftharpoons COO^- + H_3O^+$	3.0—3.5
β 和 γ-羧基(天冬氨酸和谷氨酸)	$-COOH \rightleftharpoons COO^- + H_3O^+$	3.0—4.7
咪唑(组氨酸)	$NH_2^+ \rightleftharpoons NH + H_3O^+$	5.6—7.0
α-氨基	$NH_3^+ \rightleftharpoons NH_2 + H_3O^+$	7.6—8.4
硫氢基	$SH \rightleftharpoons S^- + H_3O^+$	8.3—8.6
苯酚 OH	$OH \rightleftharpoons O^- + H_3O^+$	9.8—10.4
ε-氨基(赖氨酸)	$NH_3^+ \rightleftharpoons NH_2 + H_3O^+$	9.4—10.6
胍基(精氨酸)	$NH_2^+ \rightleftharpoons NH + H_3O^+$	11.6—12.6

的 pK 值是 9.6。处于同样情况下的各种蛋白质，由于电离基团的微环境能够导致 pK 值有很大的波动。当然在蛋白质中，大多数 α-羧基和 α-氨基被包含在肽键构成中，所以其他可电离的基团就起到比较重要的作用。

在正常情况下，蛋白质中这些电离作用的意义通过研究在各种 pH 值下赖氨酸的电离作用而搞得很清楚了。表 3 概括了从极酸到极碱的 pH 变化范围的条件下存在的赖氨酸的各种离子形式。可以看到，电荷与 pH 值成正比，并且分子在整个生理 pH 范围内(即从 5 至 9)都带电。当赖氨酸是蛋白质结构的一部分，并且不能利用 α-氨基和 α-羧基来电离时，上述情况尤其是真实的。在整个生理范围内，ε-氨基是携带正电荷的。同样，当肽键结构中不包括天冬氨酸和谷氨酸的羧基时，整个生理范围的 ε-氨基就带负电荷。

人们发现，在生理 pH 值时，大多数蛋白质仅具有少量净

表 3 赖氨酸的离子形式

各种离子形式	电 荷	pH
NH_3^+ | $(CH_2)_4$ | $^+H_3N \cdot CH \cdot COOH$	+2	<2.5
NH_3^+ | $(CH_2)_4$ | $^+H_3N \cdot CH_2 \cdot COO^-$	+1	4.5—7
NH_3^+ | $(CH_2)_4$ | $H_2N \cdot CH \cdot COO^-$	0	9.0
NH_2 | $(CH_2)_4$ | $H_2N \cdot CH \cdot COO^-$	−1	>10

电荷。确实常发现蛋白质的等电点（即蛋白质上离子电荷净值为零时的 pH）是在 4.5 到 8.5 范围内。然而必须着重指出的是，在蛋白质分子中，由于存在几个带电的残基，局部的电荷可能相当大。许多蛋白质分子为使其三级结构完整，就要依靠这些电荷来维持。同样，一个酶的催化活力大多也是依赖于活性中心部位氨基酸残基侧链的电离作用状态。

2.8 三 级 结 构

蛋白质除了由于一级和二级结构的特性而使其分子的大

小和形状受到限制外，每种蛋白质分子在溶液中还具有各自独特的形状，这种形状称为它的三级结构。这种形状是许多分子间相互作用力的结果，并表现出蛋白质分子的卷曲和折叠，从而形成了最稳定的结构。氨基酸残基侧链之间四种主要的相互作用力可以认为是：

（1）带电部分之间的静电相互作用：由于已确认的不同电荷之间相吸而相同电荷之间相斥的现象，保证了蛋白质分子的某些区域可通过静电之间的作用而聚集在一起。可能具有这些相互作用的氨基酸有组氨酸、赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸和酪氨酸。

（2）氢键：丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸所具有的 OH 基，对形成氢键特别重要，侧链羧基也包括在内。

（3）疏水性和亲水性的相互作用：如前所述，可以根据氨基酸残基的侧链与水的相互作用而明确地进行分类。疏水基团对维持三级结构特别重要。这类基团趋向于相互作用而在蛋白质中心造成一种非水环境。这样水就受到排斥，而基团的疏水性则由于水溶液中的蛋白质而满足。因此当详细测定一个蛋白质的三级结构时，通常发现大多数非极性的疏水基团在结构的内部，相反，极性的亲水基团经常在结构的外部。

（4）范德瓦力：分子的全部原子在一定程度上都与其邻近的其他分子的原子相作用，这样就能够确定个别原子接近的紧密距离。这一距离取决于核电荷的值以及围绕该核的电子分布性质。当蛋白质链卷曲和折叠时，其中各种原子接近的紧密性可根据这些考虑来测定。 这些相互作用概括在图

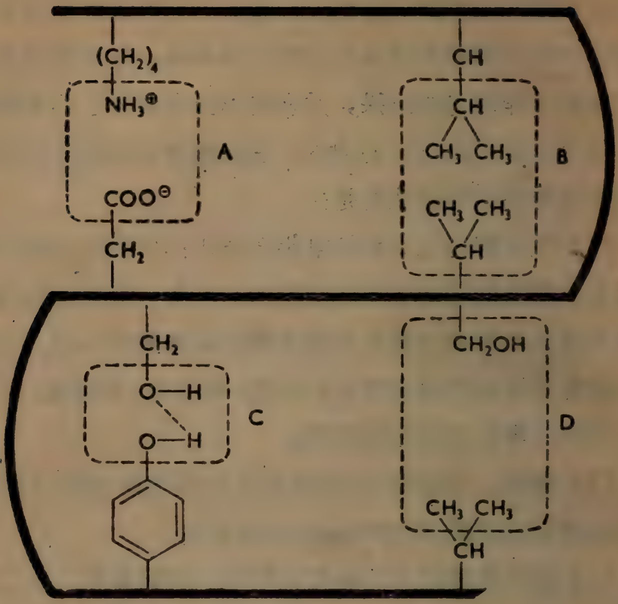


图 2-8　三级结构中包括的相互作用。A. 静电的，B. 疏水的，C. 氢键，D. 范德瓦力。

2-8 中。蛋白质的三级结构体现了所有这些效应的总和。这样，在任何一些特定情况下都能形成最稳定的结构。这种结构表示了该系统的最低能量状态。

可能该系统还有另外一些极相似的能量状态，并且条件的细微变化就使三级结构发生改变。因此热效应是扰乱了三级结构，引起重新卷曲和重新折叠，可导致酶活力的丧失。

再来讨论一下核糖核酸酶，图 2-9 显示了该酶三级结构的轮廓。从图中可以看出，由于二级结构和三级结构的联合效应，使活性中心所包含的各种基团聚合在一起，从而为催化活

图 2-9　核糖核酸酶的三级结构。12 和 119 位的组氨酸及 7 和 41 位的赖氨酸已聚集在活性中心上。

力提供了必要的定向。这种分子的表示法着重在主链的折叠上，并不给出结构紧密度的一种真正的印象。不过示意图却强调了在分子中的适合 RNA 分子的裂口。

2.9 四级结构

近几年来，人们已认识到很多蛋白质并不是以单条折叠的多肽链的正常形式存在的，而是这些单链（称作单体）相互结合产生具有多条单体单位的完整结构。对蛋白质的这种完全的描述称为四级结构。在功能性蛋白质中已经发现有不同

数目的单体，如二聚体、三聚体和四聚体有规则地发生，还报导有更高的组织状态，如含有 12 个亚单位的蛋白质分子。在更复杂的情况下，四级结构可能由两种不同的亚单位组成。通常发现当蛋白质被解离成单体的链时，分子的性质也就改变了。譬如，可能会对不同的底物产生反应；最适作用条件可能发生改变；或在最极端的情况下催化活力可能完全丧失。一般来讲，通过使单体重结合重新形成四级结构，就可能恢复其活力。业已证明，在自然界，单体和多聚体之间建立了一种平衡，很显然，影响这种平衡的各种因素将依次修饰和控制催化活力。在第五章将会看到通过控制所含酶的亚单位结构控制代谢的一些例子。

在描述了蛋白质结构的详细情形以后，我们现在可以把注意力专门地转向酶，考虑这些特化了的蛋白质分子所特有的一些性质和研究方法。

3. 命名法、辅酶和酶学方法

3.1 命名法

当第一个酶被发现并被部分地鉴定后，由于各研究者的意见有时一致有时不一致，因之命名问题被拖延下来。在这个时期，流行的名称反映了对酶研究的许多方面以及酶的性质。胰脏的蛋白水解酶——胰蛋白酶这个名称来自希腊字，意思是"磨擦"，反映了这个酶是通过把胰脏与各种溶剂共同研磨而提取的。另外一些酶是以它们的发现者而命名的或者反映了酶的明显的物理性质，例如"老黄酶"。有些情形是人们试图把所催化的反应本质的一些象征能包含在名称中。最早发现的一个酶是来自刀豆，称作脲酶。虽说这个名称指出了这个酶所催化的反应底物是尿素，但对产物的性质或所催化的反应类型却得不到任何信息。不过这个命名反映了二十世纪初期逐渐增加的习惯用法，即在底物名称后加一词尾-ase来命名酶。

随着上百个酶的发现，有些酶能够催化同一底物的不同反应，因而重新考虑酶的命名法的基础就变得很迫切了。国际生物化学联合会组成了一个委员会来研究这个问题，后来于1964年公布了一个方案。方案确定酶的名称应反应出底物的性质和被催化的反应的类型，所有资料应以描述反应的

正式化学方程式为准。为了推进这种命名法，已确定了六大反应类型，所有已知的酶都归入其中一类。尽管这个系统有些武断，并且在一些情形下还不规则，但证明具有一定的价值，现已普遍采用。由于有些系统名称还颇繁琐(这种繁琐使其不可能混淆)，所以使用以前的俗名仍然是允许的。

所规定的六大类酶如下：

（1）氧化还原酶类：催化所有的被认为是氧化-还原类型的反应。

（2）转移酶类：催化一个基团从一种底物转移到另一种底物上去。

（3）水解酶类：催化水解反应。

（4）裂解酶类：催化加到一个双键上去或从一种底物上移去一个基团而没有水解作用的反应，并常会留下一个含有双键的化合物。

（5）异构酶类：催化净结果是一种分子内的重排反应。

（6）连接酶类：利用焦磷酸键断裂(如在腺苷三磷酸)而产生的能量，催化两种底物分子之间的键的形成。

在详细讨论各种分类法使用的例子以前，必须先考虑酶反应中某些专一的非蛋白分子的作用。这些分子包括 ATP，统称辅酶。

3.2 辅　酶

很多酶由于负担催化反应的范围广泛，其催化活力需要

存在小的非蛋白分子，即所谓辅基参与。这些分子可以与酶牢固地结合在一起，或者只是与酶松松的缔合。因为它们是与实际的催化作用密切有关，所以也称它们为辅因子或辅酶。早期的工作者们对那些与酶牢固结合的分子倾向保留使用辅基这个词，而用辅酶来指一种松松的缔合。然而这种区分纯粹是理论上的，现在已经认识到了与酶的缔合程度的全部范围。除了在催化作用中涉及的酶蛋白以外所有分子都用辅酶这一词是更有意义的。底物和辅酶之间的区别还不太确切。从很多意义上讲，辅酶可能是作为一种底物而起作用。然而另一方面，底物只对很有限的几种反应是专一的，而在大量的相似类型的反应中可能涉及同一个辅酶。在某种情况下，反应总结果可能只剩下辅酶分子形式没有改变，不过，即使辅酶的分子形式改变了，常发现在以后的反应中会恢复原状。因此，可以把辅酶定义为是在各式各样的酶促反应中具有专一功能的，以及或是在反应终了都没有变化，或是在以后的一些反应过程中又重新生成的一种小的非蛋白分子。

讨论一下氧化-还原反应的总范围。在这类反应中所涉及的最普通的辅酶就是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）。核苷酸类的结构通式是：

碱基—糖—磷酸

属于二核苷酸的 NAD 的结构是：

烟酰胺—核糖—磷酸—磷酸—核糖—腺嘌呤

图 3-1 显示了这个辅酶部分的详细化学结构。此辅酶有还原和氧化两种形式，所以其氧化形式在催化作用中能起到一种

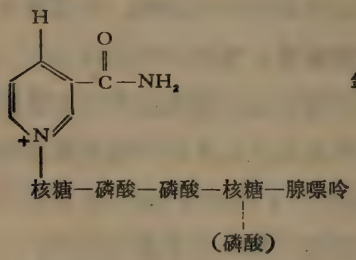
氢受体的作用。在方程式中，氧化形式通常写作NAD^+，因此我们可以写成:

$$NAD^+ + 2H \rightleftharpoons NADH + H^+$$

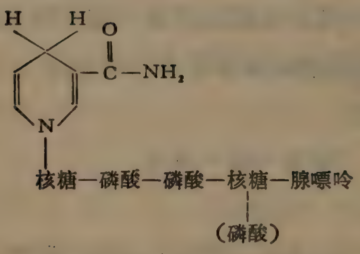
式中的氢通常是从底物产生的，可以看到辅酶起了氢受体的作用。然后形成的 NADH 把氢转移给线粒体中的电子传递链的其他受体，于是 NAD^+ 又重新产生。涉及 NAD 反应的最简单例子是通过醇：NAD 氧化还原酶(俗称醇脱氢酶)的作用，将乙醇氧化成乙醛:

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3CHO + NADH + H^+$$

酶的系统名称给出了这个反应的全部情况。它说明了乙醇进



氧化形式



还原形式

图 3-1 氧化的和还原的 NAD 和 NADP 的结构。烟酰胺环全部显示了已指出的还原作用的性质。虚线表示在 NADP 中另一个磷酸的位置。

行的氧化-还原反应，并且 NAD 是氢受体。

在各种各样相似的反应中，包括醇类氧化成醛类、醛类氧化成酸类以及烃链的去饱和作用，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸都是起氢受体的作用。通常发现 NAD 是作为一种氢受体，其相反的作用，即 NADH 起氢供体的作用是不常见的。NAD^+ 主要的再氧化作用是通过电子传递链的。

与 NAD 密切有关的是辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP)。它与 NAD 不同之处在于分子的腺嘌呤部分的核糖上多了一个磷酸基团（见图 3-1)。NADP 的功能与 NAD 的功能颇为不同。它只是在有限的几个反应中起氢受体的作用，而在很多不同的反应中则是起氢供体的作用，并且可以把它看作是生物还原力的来源。

辅酶 ATP 显示出一种完全不同类型的功能。三磷酸腺苷又是一种多了两个磷酸基团的核苷酸。各部分的排列方式是:

腺嘌呤—核糖—磷酸—磷酸—磷酸

图 3-2 给出了 ATP 的详细结构。ATP 是细胞中化学能的初级来源。当糖类、脂肪、氨基酸和许多其他碳化合物被氧化成二氧化碳和水时，便产生了 ATP。这些过程与燃烧过程相似，只不过能量的释放以热的形式代替了，氧化作用是和 ATP 的产生偶联的，然后 ATP 由细胞贮存，当需要时它便提供能源。因此 ATP 对于细胞的能量代谢是至为重要的。由于它的高能性质，使 ATP 占有特殊的位置。当 ATP 的末端磷酸基被水解产生二磷酸腺苷和无机磷酸时，便释放出大量的

自由能。按细胞内的情况，这些能量可以多到 50 千焦耳/克分子。而一个简单的糖类磷酸酯(如葡萄糖-6-磷酸)水解成葡萄糖和无机磷时释放的能量是相当小的，一般是 16.7 千焦耳/克分子左右。因为 ATP 及一些与其密切有关的化合物水解时可释放较大量的能量，所以称它们为“高能化合物”。必须着重说明的是，关于这类化合物并没有什么特别不可思议的。纯粹是由于通过水解作用而释放能量的能力才认为有必要另外考虑它们。有时称末端磷酸键为“高能磷酸键”，但使用这个名称会使人误解，因为这个名称意味着这是氧和磷原子之间的一种异常的键合，其实这是不合乎事实的。同样，当 ADP 被水解成腺苷一磷酸（AMP）和无机磷时，释放出来的能也是

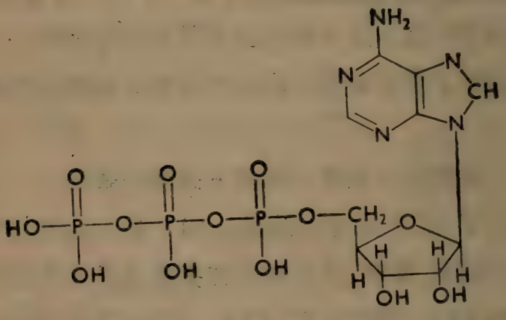


图 3-2 ATP 的结构

高的。不过当最后一个磷酸基团被移去时，即当 AMP 被水解成腺苷和磷酸时，释放的能量的能级与一个简单的磷酸酯水解时所释放的能量的能级相同。这种现象的原因极为复杂，不过主要是基于共振结构的可能性以及 ATP、ADP 和 AMP

的相对稳定性。

ATP作为辅酶而作用的一种方式是可以当作一种磷酸供体，与 NADPH 作为氢供体的作用方式相似。葡萄糖转化为葡萄糖-6-磷酸是被 ATP：葡萄糖-6-磷酸转移酶(俗称葡糖激酶)所催化的，如下列方程式所示：

$$\text{ATP} + \text{葡萄糖} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{葡萄糖-6-磷酸}$$

ATP 的其他辅酶功能，其中包括为两种底物分子之间形成一个共价键提供所需的能量。丙酮酸和二氧化碳转化成草酰乙酸可用正式方程式表示之：

$$CH_3CO \cdot COOH + CO_2 + ATP + H_2O \rightleftharpoons HOOC \cdot CH_2 \cdot CO \cdot COOH + ADP + \text{磷酸}$$

ATP 的水解是与在草酰乙酸中合成一个 C—C 键相偶联的。催化这类反应的酶称为连接酶或合成酶，在这个例子中的专一酶是丙酮酸：二氧化碳连接酶(俗名是丙酮酸羧化酶)。

丙酮酸羧化酶的特点是在其催化活力中要涉及第二个辅酶。这个辅酶是生物素。与 ATP 不同，生物素和酶牢固结合。具有复杂的杂环结构的生物素的作用是使二氧化碳与酶相连结，因此促进了丙酮酸与二氧化碳的结合。这种连结和转移二氧化碳的能力是生物素的辅酶功能通常具有的特点。

还有许多其他的辅酶和上面所举的例子一样，它们在代谢中各具有一种单独的和专一的用途。某些辅酶与维生素密切有关。烟酸是 NAD 分子中烟酰胺部分的直接前体。尽管饮食中烟酸并非绝对必要，因为烟酰胺可以从色氨酸衍生而得到，但饮食中充分提供烟酸这种维生素，对人体还是有益

的。对某些辅酶来讲，从饮食中摄取维生素的前体对于正常的代谢功能是绝对必要的。

3.3 酶的分类和编号

表 4 列出了酶的六个大类以及每类酶再细分类的表示方法。此外，每大类酶举出了一个代表性的例子及其代号。这

表 4 酶的分类和编号

1. 氧化还原酶类	
亚-部分:	底物的性质，如醇
1·1·1·27	乳酸:NAD 氧化还原酶
2. 转移酶类	
亚-部分:	被转移的基团，如磷酸基团
2·7·1·2	ATP:葡萄糖-6-磷酸转移酶
3. 水解酶类	
亚-部分:	被水解的键，如酯键
3·1·3·9	葡萄糖-6-磷酸磷酸水解酶
4. 裂解酶类	
亚-部分:	底物的性质，如胺
4·3·1·1	天冬氨酸解氨酶
5. 异构酶类	
亚-部分:	异构现象的类型，如消旋酶
5·1·1·1	丙氨酸消旋酶
6. 连接酶类	
亚-部分:	形成的键，如C—C键
6·4·1·1	丙酮酸:二氧化碳连接酶

种代号由四个数字组成。第一个数字代表酶的总的大类，第二和第三个数字代表酶被指定的亚-和亚-亚-类，第四个数

字代表这个酶在亚-类中所占的位置。醇脱氢酶的详细编号是：

醇：NAD 氧化还原酶：

1·1·1·1

氧化还原酶　底物醇　受体为NAD　在此类酶中占第一号位置

3.4 酶活力的测定

事实上是不可能直接测量任何酶的量的。理论上讲，如果一种酶含有某些罕见的和特异的特点，譬如金属离子，那么测定那一特点就是测量出了酶的量。然而，这是假设在这个系统中除含有金属离子外不存在其他任何组分。并且除非是最纯的酶制剂，否则这种假设对所有的酶来说都是不能证实的。因此直接测定酶的方法没有普遍的应用价值。

酶通常是通过它们的催化活力来测定的，即测定酶所催化的反应的速率并与未被酶催化的反应速率相比较。就大多数反应来说，未被催化的反应速率是非常低的，并且对所有的实用目的来说可以忽略。然而必须指出，在任何给定的一系列实验条件下，在用这种近似法以前速率要低。

测定酶促反应的方法就象已知的酶促反应的数目一样，也是各种各样的。然而，可以看出某些实验技术的适用范围是很广的。

（1）分光光度法：如果在底物向产物的转化中，在紫外

光和可见光光谱范围内，反应系统的光吸收性质有某些特异的和适当大的变化的话，那么这种变化就可以利用来追踪这个反应。在追踪 NAD 是辅酶的反应中，此项技术特别有用。NAD 和 NADH 二者的最大吸收峰都在 260 毫微米，而在这个波长时二者等克分子溶液的吸收之间仅有一个小的百分率差别。然而，NADH 在 340 毫微米还有一个吸收峰，NAD 在这个波长的吸收则微不足道（图 3-3）。所以可以通过测量醇和 NAD 的合适溶液在 340 毫微米处的光吸收来研究醇脱氢酶。在一个给定的时刻加入一定量的酶，每 15 秒的间隔测定一下这个系统的光吸收，共测 3 分钟。光吸收的增长率即是形成的 NADH 的量，也就是所催化的反应的速率的度量。

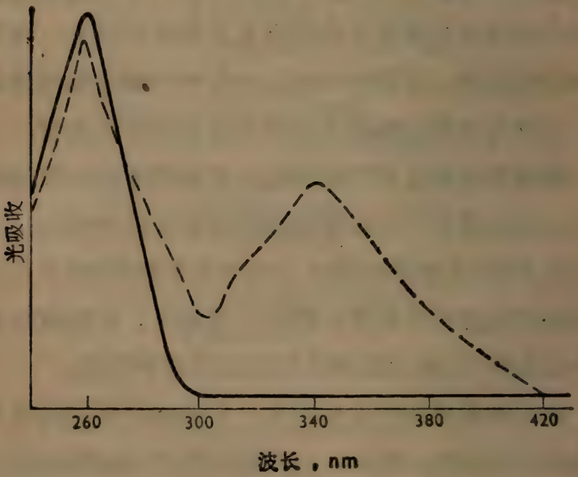
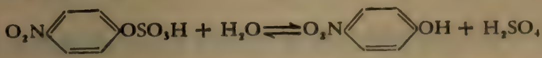


图 3-3 NAD（实线）和 NADH（虚线）的吸收光谱。

人们把在特定条件下一分钟内可催化 1 微克分子的底物

转变成产物所需要的酶量定为 1 个酶活力单位。特定条件包括 pH 值、底物的浓度和温度。曾经提出了各种标准温度，但实际上所用的温度是根据所研究的酶的生物来源而定的。因此通常是在 37℃ 测定取自温血动物的酶，而可以在较低的温度（如 25℃）下测定取自微生物的酶。以醇脱氢酶为例，知道了 1 克分子的 NADH 溶液的光吸收，那么就能得到单位时间内 NADH 形成的量，因此也就得出了酶活力的单位数。

在水解酶的研究中，大多是利用从邻位和对位硝基苯酚衍生来的合成底物。芳香基硫酸酯酶可按照下列方程式水解对-硝基苯酚硫酸盐：



在碱性 pH 时，释放的对-硝基苯酚在 400 毫微米处有一个大的吸收高峰，而有机硫酸盐在此浓度几乎没有吸收。假如一种酶在碱性条件下作用，或在一定时间间隔后加入强碱以终止反应，那么就可以通过测定在 400 毫微米处增加的光吸收来测定这个酶。还有很多相似的底物都能以这种方式加以利用。

（2）pH 测定：许多反应，特别是水解反应，可产生酸性产物。芳基硫酸酯酶产生硫酸，所以这个反应在非缓冲溶液中可用一灵敏的 pH 计来追踪。在这种方式中所用的技术固有的不利之处是 pH 经常在变化，而这点进而就很可能影响对 pH 的改变敏感的酶活力。为了克服这一点，已制造出一种称为 pH 稳定计的仪器，这种仪器可以监控 pH，在适当时候加入酸或碱，以保持 pH 恒定，并按时记录加入的量。

（3）测压法：这种技术常用来研究呼吸作用，即由细胞匀浆所摄取的氧并同时产生的二氧化碳。可以测定一定容量下反应系统压力的变化，而且经过适宜的装置也能计算氧吸收和放出的二氧化碳。这种直接的测定方法只限于用来研究个别一些酶，因为只有极少数情形才有气体的摄取或放出。这种技术可以扩大到用来研究因反应系统中含有碳酸氢盐而产生酸的反应，也可测量由于酸的作用而放出的二氧化碳。

近年来，这一技术已部分被氧电极的发展所取代，氧电极是测量一个溶液的氧张力，其方式与用氢电极来测量 pH 相似。

（4）一般化学方法：在有些情况下，上述这些专门的酶测定法一个都不能用。这时就必须利用一些普通的化学方法来追踪底物的消失或产物的出现。例如，测定催化磷酸酯类水解的一些酶，可采用在反应进行一段时间后，剧烈改变 pH 或加热使酶失活来停止催化作用，然后用标准磷酸盐分析法测定释放出来的磷酸盐，例如形成磷钼酸盐复合体并还原之。同样，催化蛋白质水解的一些酶，可以用估计自由基团的增加来测定。在这些情况中通常是利用化学分析的比色法，因为这些方法快速、方便、灵敏。事实上，分光光度计已经成为酶学家的最有价值的工具。

3.5 一级顺序的测定

为了充分了解任何酶促反应的性质，有必要全面阐述酶

催化剂的结构。这一过程的第一步就是测定酶分子的一级顺序。

要测定一级顺序，前提是分析分子中的氨基酸残基。将一个纯的蛋白质置于一封闭管中，于氮气下用 6 MHCl 处理，在 105℃ 下作用 24 小时使其水解（或在 15 磅/英寸^2 中高压蒸煮 4 小时）。把所得的氨基酸溶液在减压下蒸发至干燥，并重新溶于一低 pH 的缓冲液中。然后把此溶液通过离子交换树脂柱。这种离子交换树脂是由聚合物制成，如聚苯乙烯，并且已经可以用不同的电离基团来取代。树脂是以经过筛选过的珠状形式供应的，以便大小范围较一致，这样可以保证溶液以一种适当的、并可重复的流速通过树脂柱。另外，树脂在制造过程中就已仔细地控制了它的交联度。那些具有高交联度的树脂，形成一种编结很紧密的网络，它只允许小分子通过。这种树脂适合用来分离氨基酸和类似的分子，但对分离蛋白质则无效，因为蛋白质分子会被陷在网络中。在低 pH 时，所有的氨基酸都具有净正电荷，当它们渗过交换柱时，便与带负电荷的树脂牢固地结合。为了分离氨基酸，常使用已用磺酸取代的聚苯乙烯。磺酸是一种很强的酸，可以认为它已完全电离。

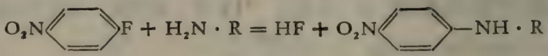
$$树脂—SO_3H + H_2O \rightleftharpoons 树脂—SO_3^- + H_3O^+$$

在酸溶液中氨基酸的形式是：$^+H_3N \cdot CHR \cdot COOH$ 并且建立如下一种平衡：

$$树脂—SO_3^- + {}^+H_3N \cdot CHR \cdot COOH \rightleftharpoons 树脂—SO_3^- + {}^+H_3N \cdot CHR \cdot COOH$$

这个平衡向右手方向进行得很远。因此氨基酸与交换柱是静电结合。当洗脱缓冲液的 pH 增大时，氨基酸上面的正电荷减少，直到氨基与树脂的结合减弱到可以被洗下时为止。每种氨基酸达到这一点的条件是不同的，这取决于分子上其他可电离基团的性质，在非极性氨基酸的情况下，甚至还取决于侧链的性质。因此利用在低 pH 时吸附氨基酸，然后再慢慢提高洗脱剂的 pH 和离子强度，就能成功地做到重复性好而又轮廓清楚地把所有氨基酸分开。在现代实际中，这种过程已全部自动化了。为了容易分开，氨基酸的混合物被自动地放到一根至少含有二种类型树脂的柱上去。在洗脱缓冲液中，产生一种 pH 和离子强度的梯度，然后把从柱底流出的氨基酸用比色测定法监控，测得的结果接着就被记录于记录纸上。在最精密的仪器中，比色数据可输入到台式计算机，计算机自动计算各种氨基酸的量，以及该氨基酸在原来蛋白质中的百分率，或更通常是计算残基数/1000 残基。

确定了酶的氨基酸组成后，下一步就是测定蛋白质链每一端的氨基酸，即 N-和 C-末端的氨基酸残基。N-末端氨基酸最适宜使用 1-氟代-2，4-二硝基苯（FDNB）来测定，此试剂与氨基作用产生一种黄色的二硝基苯代氨基酸（DNP-氨基酸）：



将蛋白质用 FDNB 的醇溶液处理，待反应完全后，把混合物用乙醚充分抽提，以便除去未被使用的试剂。黄色的 DNP-

蛋白质如前所述用盐酸水解，水解后释放出的黄色 DNP 氨基酸被抽提入乙醚溶液。在这个溶液中的 DNP 氨基酸有两种类型：一些是从蛋白质的 N-末端基团衍生出来的，另一些是 FDNB 与蛋白质的氨基酸中其他基团的副反应衍生出来的。在这后一种类型中包括的是 FDNB 与赖氨酸残基的 ϵ-氨基和酪氨酸的酚基的反应。然而如果酶是纯的，并且只含有一条链或一种链，那么与 α-氨基团反应衍生出的 DNP 氨基酸就只有一种，因为在任何蛋白链中只有一个这样的基团是自由的。无关的氨基酸衍生物可以通过乙醚抽取液的选择性洗涤而除去，然后将此标本在纸上、或更经常用的是在覆盖有二氧化硅凝胶薄层的玻璃板上进行层析。将未知的 DNP 氨基酸移动的距离与标准的 DNP 氨基酸的移动相比较，这样便可确定 N-末端基团。根据这个黄色的 DNP 氨基酸的比色测定，从一给定量的蛋白质中衍生出来的 N-末端基团的量就能算出。知道了蛋白质的分子量，就能计算每个分子中链的数目。现在这种技术已有了许多改进，并又发展了其他相似的专一的试剂，从而提高了这种方法的灵敏性。不过在四十年代后期由桑格（Sanger）发展的最初方法仍然在用，它的原理亦为其他许多方法所利用。

遗憾的是一些适合测定 C-末端氨基酸的方法都非常繁琐，而且可靠性差。有些方法基于这样的事实，即肼可与结合在肽键中的羧基残基反应形成酰肼、而并不与自由羧基反应。因此如果在控制的条件下将蛋白质用肼处理，蛋白质即被断裂，除 C-末端的氨基酸外，都形成了所有氨基酸的酰肼，可以

分离这个自由氨基酸，并用层析法鉴定。

要测定一个蛋白质的氨基酸顺序，必须把蛋白质断成有限数量的较小的肽单位。为了形成合理数量的肽以进行以后的分析，断裂必须是专一的和重复性好的。为此常利用纯化的蛋白酶，多半是胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和胃蛋白酶来裂解蛋白质。用这些酶去水解蛋白质只需极少量就够了，而且近年来已制成能把这些酶结合到不溶性的、不活泼的聚合支持物上去的活性衍生物。使用这些不溶性的衍生物，酶就能用离心法从水解溶液中回收并再次利用。

看一下这个十肽：

丙·苯丙·甘·亮·赖·酪·缬·精·甘·组

其氨基酸组成可以测定，并证明N-末端基团是丙氨酸。胰凝乳蛋白酶催化的是其羧基由芳香族氨基酸（即酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸）提供的肽键的水解。在本例中用胰凝乳蛋白酶处理可以得到三个肽：

(A) 丙·苯丙　(B) 甘·亮·赖·酪　(C) 缬·精·甘·组

用N-末端分析法测定氨基酸的组成可以确定A肽的结构。能够测定B的氨基酸组成并证明N-末端是甘氨酸。胰凝乳蛋白酶的专一性表明，在B肽中的C-末端氨基酸残基必定是酪氨酸。然而这个实验却不能找出亮氨酸和赖氨酸的顺序。同样，可以证明C肽中的N-末端是缬氨酸，但不能找出精氨酸、甘氨酸和组氨酸的顺序。尽管根据在B肽中含有酪氨酸而可以认为三个肽的次序是 ABC，但B肽和C肽本来的排列次序仍然是不知道的。

胰蛋白酶催化的是其羧基由碱性氨基酸（如赖氨酸和精氨酸）衍生来的肽键的水解。因此这个十肽用胰蛋白酶水解就得到这样的三个肽:

（D）丙·苯丙·甘·亮·赖 （E）酪·缬·精 （F）甘·组

D肽的N-末端基团是丙氨酸，根据氨基酸的组成及胰蛋白酶的专一性，可以推断赖氨酸是C-末端。根据比较D肽与由胰凝乳蛋白酶水解产生的肽，可以看出顺序是ABC，并且可以完全确定D肽的顺序。用胰蛋白酶消化便能同样地确定各肽的顺序是DEF，从而测定了这个十肽的全部氨基酸顺序。

显然，大的蛋白质分子的顺序测定会提出许多问题，但其测定方法基本上是与测定这个十肽的方法一样的。将蛋白质先用胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶分裂成较小的、容易确定的肽。然后利用某些取决于肽的电荷的技术将这些肽分离。这类技术包括电泳，在电泳时带电荷的样品在电场中移动，移动速度取决于分子的电荷和大小；还有离子交换层析法，该法是依靠在不同情况下，样品与带有电荷的离子交换树脂结合力的不同来分离肽。然后找出各肽的详细顺序。采取利用两种酶提供的“重叠法”，就可以弄清楚蛋白质的一级顺序。某些试剂可用来测定很大的蛋白质的结构，这些试剂可在一定的氨基酸残基处专一性地切断键，如溴化氰可以在甲硫氨酸残基之后的地方切断。蛋白质通过这种断裂首先变成比较容易处理的肽。含有数百个氨基酸的蛋白质的结构都可以用这种方法搞清楚。

3.6 活性中心的测定

为了测定酶活性部位上的氨基酸性质，曾设计了很多方法。下一章将讨论物理学方法和动力学方法。化学方法可分成两类：一类是利用底物或底物类似物；另一类是利用基团专一性试剂，即利用已知与专一的氨基酸基团作用，但却与该酶的底物无关的试剂。

利用二异丙基氟磷酸测定蛋白酶类的活性中心，就是第一类的一个例子。二异丙基氟磷酸（DFP）与丝氨酸残基的羟基作用：

$$\left(\begin{matrix}CH_3\\ CH_3\end{matrix}\!\!>CHO\right)_2\overset{\overset{O}{\|}}{P}\cdot F + ROH \longrightarrow \left(\begin{matrix}CH_3\\ CH_3\end{matrix}\!\!>CHO\right)_2\overset{\overset{O}{\|}}{P}\cdot OR + HF$$

DFP 与正常底物极其相似，与酶形成的共价复合物和酶底物复合物相类似。然而这个共价复合物比底物复合物更稳定，它的断裂可以忽略不计。尽管分子中每一个丝氨酸残基都有可能与 DFP 作用，但如果严格控制反应的时间和条件，DFP 就会首先与活性部位的丝氨酸反应，推测大概因为活性部位的丝氨酸更加活泼，并且比其他氨基酸残基更容易接近，而其他丝氨酸可能被卷在一些二级或三级结构的折叠中。DFP 开始只与胰凝乳蛋白酶的一个丝氨酸残基作用。然后把作用后的蛋白质水解，采用与测定蛋白质一级顺序相类似的方法，测定已与 DFP 作用的特殊的氨基酸残基。如果蛋白质与 DFP 作用未使酶丧失活性，那么可以假定这个丝氨酸不是酶活性

部位上的残基之一。有很多可被 DFP 专一性抑制的蛋白酶和酯酶，并且已搞清了它们的活性中心氨基酸顺序。此顺序已归纳列于表 5 中。大多数情况下，丝氨酸残基周围的氨基酸是相似的。可以认为所有这些酶所催化的反应的机制也是极其相似的。在酶的活性部位的其他一些部分还发现了酶的底物专一性，这些其他部位决定了哪一个分子是牢固地和酶结合在一起的。因此，酶的活性部位可以再分成与底物分子结合有关的残基和催化键的转化的残基，即可分成结合部位和催化部位。

表 5　几种蛋白酶和酯酶活性部位丝氨酸周围的残基

胰凝乳蛋白酶	天冬·丝·甘
胰蛋白酶	天冬·丝·甘
弹性蛋白酶	天冬·丝·甘
凝血酶	天冬·丝·甘
枯草杆菌蛋白酶	苏·丝·甲硫
酪蛋白酶	苏·丝·甲硫
乙酰胆碱酯酶	谷·丝·丙
碱性磷酸酶	天冬·丝·丙

因为很多酶没有合适的底物或底物类似物可形成共价复合物，所以在这种情况下必须利用不太专一的基团的试剂。很多氧化还原酶的催化活力依赖于活性部位上的半胱氨酸的硫氢基。这些硫氢基可与对氯汞苯甲酸（PCMB）作用：

$$R \cdot SH + Cl \cdot HgC_6H_4COOH = R \cdot SHgC_6H_4COOH + HCl$$

然而不仅仅是在活性部位的SH基起作用，在氨基酸侧链上的一些其他基团也会起作用。所以如果一个酶由于与 PCMB 作

用而丧失其催化活力，就不能区别是活性部位受阻断，还是导致活性部位构型破坏的三级结构改变了。这个困难可以在底物大量过剩时通过酶与 PCMB 作用而部分得到克服。底物将会接到活性部位上去，并阻止了酶与 PCMB 作用。在除去未反应的 PCMB 和底物后，就可测定催化活力。有时酶仍然是有活性的。如果现在这个酶是在底物缺乏的情况下与更多的 PCMB 反应的话，那么就只有活性部位可以起反应。假如作用后催化活力丧失了，说明在活性中心有某些基团可与 PCMB 发生反应。如果用放射性标记的 PCMB 来进行第二步反应，就可以测定出产生反应的氨基酸在蛋白链中的性质和位置了。

同样，如果酪氨酸是活性中心的残基，那么蛋白质的碘化作用就可以引起活力的丧失，可用 FDNB 处理来证明活性中心的赖氨酸、组氨酸和酪氨酸残基。这些方法没有一个是对鉴定活性中心残基绝对专一和具有结论性的。不过将各种方法结合使用，再参考从动力学研究得到的证据，很多酶的活性中心的性质是可以测定出来的。

3.7 大小和形状的测定

详细讨论用物理技术来测定酶分子的大小和形状，超出了本书的范围，不过可以简略地描述一下所采用的各种方法。

找出蛋白质的近似分子量最常用的方法之一就是凝胶过滤法。将欲测的蛋白质溶液通过一个装有用交联多聚体制成

的小珠状体的柱。小分子（如氨基酸）能够穿透珠状体的细孔，较大的蛋白质分子则不能穿透并直接通过柱，也就是说都被珠状体所斥。一些中等大小的分子比氨基酸较难穿透凝胶珠状体，从而也部分地被排斥掉了。这种现象在图 3-4 中作了图解。凝胶珠状体是经过这些选择，以使欲测的蛋白质只是部分地被排斥。

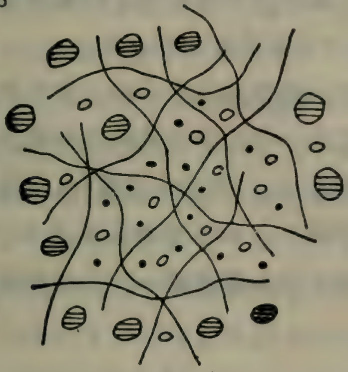


图 3-4　凝胶过滤示意图，显示出被包住的、排斥的及部分地被排斥的分子。

这种技术的详细理论是极其复杂的。不过实际用来测定分子量却是非常简单的。将少量含有已知分子量的或未知分子量的蛋白质浓溶液，从凝胶珠状体柱的顶部加入，凝胶珠状体事先在适当的缓冲溶液中泡胀，并放入柱内使形成一均匀的柱。用缓冲液从柱的顶部冲洗样品，把通过柱流出的液体收集在一个部分收集器中，分段收集器保持每部分的流出液容积尽可能地小。洗脱一种特殊蛋白质所用缓冲液的容积可用分析该蛋白质的各流出部分来测定。将已知分子量的蛋白质洗脱容积，与未知分子量的蛋白质的洗脱容积加以比较，

就可以估计出它的分子量，其精确度约为5%。实际上，当用这种技术测定时，发现某些蛋白质具有一种不规则的分子量。这些蛋白质一般是呈纤维状或雪茄状，所以，测得的分子量不能给出一种真正的大小的指征。理论上讲，凝胶过滤法是假设蛋白质是呈球形的，为了进入凝胶珠状体网络时不需要一种特异的排列。显然这种设想对于纤维状分子来说是行不通的，因此测得的分子量是变化不定的。

有一种普通的流体动力学方法，是用超离心机测定沉降速度。超离心机由一个功率很高的发动机组成，发动机带动装有被试样品的转子，在真空室中进行，以使由于空气粒子产生的热效应减到最小。转子能够以高达65,000转数/分的速度旋转。这样就在样品中造成一种甚至是地心引力300,000

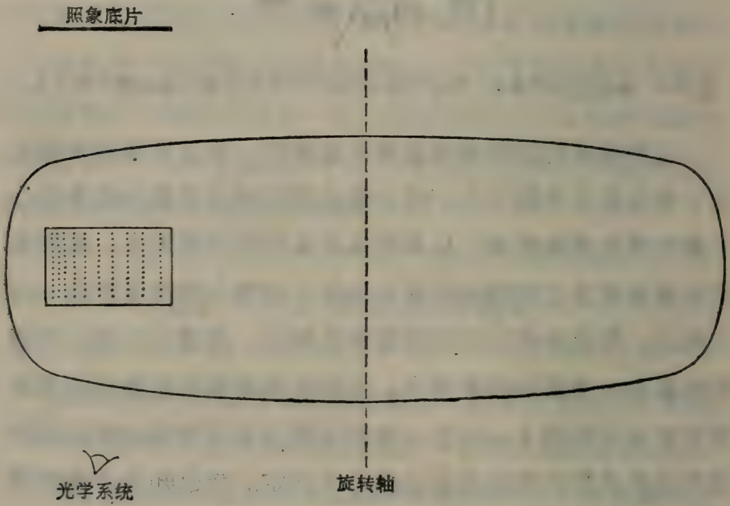


图3-5　超离心机中蛋白质分子的沉降。

倍的引力场。离心前，蛋白质是均匀地分布在溶液中的，而在高速度离心一段时间后，蛋白质分子开始沉降，如图 3-5 所示。距旋转轴最近的样品浓度变稀。在超离心机中包括有一个复杂的光学系统，是用来测定随着距旋转轴距离不同浓度的变化率。这种变化被自动记录于照象底片上，从而可以计算在引力场中蛋白质的运动速率。此速率与蛋白质分子的大小和形状成函数关系，因此就可以算出来。

利用这些以及类似的技术，或单独使用，或结合使用，就可以测出很多蛋白质的分子量及其大致的形状。然而这种形状只不过是近似的，用这些技术并不能得到所有的原子空间分布的真正指征。只有 X 射线衍射分析可以测定出详细结构。X 射线被电子所散射，其散射程度与分子中任何点电子密度成正比。为了能测定 X 射线散射并避免相邻分子的散射干扰，分子必须是在空间排列的。结晶体就是分子的有序排列，所以用这种技术测定蛋白质结构的先决条件就是要使蛋白质结晶。这件事常常并不是容易的，要长成大小和结构都满意的结晶，可能要花好几年的时间。通常蛋白质的金属衍生物都是结晶化的，因为金属是很好的 X 射线散射中心，它将为其他可能与电子密度有关的分子提供一个参考点。从 X 射线被蛋白质晶体的散射而得到的衍射照像的详细情况，可用高速电子计算机来分析，用这种方法，建立起了一种分子的电子密度的三维图形。可以测得 0.2 毫微米的蛋白质分辨率。正如图 2-1 中所示，肽键各原子之间相距大约就是这个距离。蛋白质链上相邻部分的原子互相可接近到约 0.3 毫微米。这

就给出了在这种分辨率下可以得到的结构细节的指征。遗憾的是，这种技术是既费钱又费工，而且也很难得到满意的结晶，所以目前只限于在相当少数几种蛋白质中应用。

4. 影响酶活力的因素

4.1 酶-底物复合体的形成

根据定义来看，虽然酶作为催化剂在反应终止时本身不发生变化，但是在反应过程中酶和底物必定会以某种专一的物理的或化学的方式相互作用。这个事实可用简单的反应形式来表示：

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftharpoons}} E + P \qquad (1)$$

其中 E、S 和 P 分别代表酶、底物和产物，ES 是作为中间物而形成的酶-底物复合体。从游离的酶和底物形成复合体以及逆向解离过程的速率常数分别以 k_{+1} 和 k_{-1} 表示，而相应酶和产物的缔合和解离反应的速率常数分别以 k_{+2} 和 k_{-2} 表示。

能够区分出两种主要类型的酶-底物复合体。某种情况下复合体相对地是稳定的，酶和底物之间就形成共价键，而在另一种情况下，复合体是瞬变的。前一种情况就有可能将复合体分离和纯化。这种复合体可以在酶和底物之间的缔合是迅速的(即 k_{+1} 很大)，但随后解离成游离酶和产物，在相对地慢(即 k_{+2} 非常小)的反应中被检测出来。当胰凝乳蛋白酶催化简单酯类水解时，它形成一种相对稳定的酶-底物复合体。在

与酯形成复合体中，胰凝乳蛋白酶水解了酯键，而醇那一半并不与酶结合，就从反应部位扩散开去。然而酸的那一半却与酶牢固地结合，形成了共价的酰基-酶，并且可以被分离出来：

$$R_1CO \cdot OR_2 + E \rightleftharpoons R_1CO \cdot E + R_2OH$$

接着这个快反应之后，酰基胰凝乳蛋白酶慢慢分解给出 $R_1 \cdot COOH$，并产生游离酶。

在多数情况下，形成的复合体是极不稳定的，仅仅存在一刹那。这个快速形成的复合体紧跟着又同样快地分裂成游离的酶和产物。在这种情况下从未能把这个复合体分离出来，其形成必须用极为快速和非常敏感的技术来跟踪。与过氧化物酶形成的复合体就可以用这种方式来研究。此酶催化过氧化氢水解成水，而同时使某些合适的还原性物质氧化。这个反应可用方程式表示：

$$H_2O_2 + E \rightleftharpoons H_2O + \text{氧化的酶}$$

$$\text{氧化的酶} + H_2R \rightleftharpoons R + H_2O + E$$

氧化了的酶与原来的酶有不同的光谱性质，尽管它只以很小量存在，但可以用敏感的分光光度计检测出来。

在详细讨论影响酶反应的各种因素前，有必要充实一下活性中心的概念。从表 5 中可以看到，在某些酶的活性中心中，丝氨酸周围的区域是非常相似的。所以有可能为这些酶设计一种键断裂方式的通用方案。酶的专一性在于与底物结合形成复合体的酶上的各种基团的性质。这些想法是由科什兰（Koshland）构思出来的，如图 4-1 所示。科什兰认为，蛋白质

是由四种类型的氨基酸残基构成的：

(a) 非必需的。这些氨基酸对催化过程不起直接的或间接的作用。在某种情况下，把它们除去也不会使酶丧失活力。常常可以在酶的表面发现这些残基。

图 4-1 活性部位的图解表示法。(黑圆点)结合部位；(黑三角)与底物键(用锯齿线表示)发生反应的催化部位；(空心圆)在表面上的非必需残基；(黑方块)帮助维持三级结构的残基。

(b) 与维持酶分子完整的三级结构有关的残基。这些残基的改变虽然并不直接与底物的结合或它的转化有关，但还是会由于活性部位的空间定位消失而导致丧失催化活力。

(c) 结合残基。当底物与酶分子紧密接近时，这类残基使得底物就位，而它这样定位以使被改变了的键能接近催化残基。

(d) 催化残基。实际上它是催化键的转化。

与古老的酶作用的锁和钥匙理论相反，在这个理论中酶和底物之间的关系是严格的和预定的，科什兰提出了"诱导契

合"学说。在与底物的结合上，酶具有相当大的自由度，可以改变它的构象，并使自身部分地包围底物，从而使催化基团准确地排列好。尽管这个观念已有过许多修正和更改，但可以用它来描述解释酶活力的分子探讨，这种探讨方式在六十年代已有了特别的进展。

4.2 酶 浓 度

酶催化的反应的速率是与存在的酶浓度直接成正比的，如图 4-2 所示。为了准确地测量酶的活力，这种线性关系的

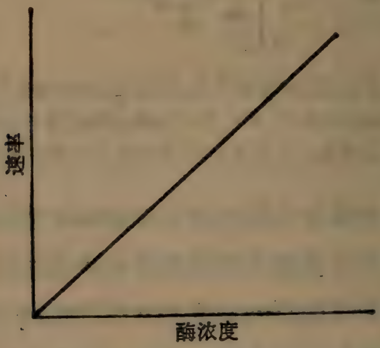


图 4-2 酶浓度对酶反应速率的效应。

有效性是绝对必要的。这种关系只有在某些严格限定的条件下才是真实的。系统的 pH 及温度必须是恒定的，底物必须存在过量。如果底物不存在过量，则在测定过程中底物浓度就会发生显著的变动，其变动的程度将取决于酶的浓度。我

们在后一节将会看到反应的速率依赖于底物的浓度，而当测定一种酶时，必须保证测定时底物被转化的百分率只是微不足道的。一般说来，酶和底物的浓度是这样调节的，以使测定时所消耗的底物不到1%，现代仪器设备的灵敏度可以很准确地测出这种相对来讲是很小的变化。

4.3 时　间

图4-3给出了通常反应程度随时间的变化。曲线图有两个不同的区域。在最初的一段时间，被转化的底物的量与反

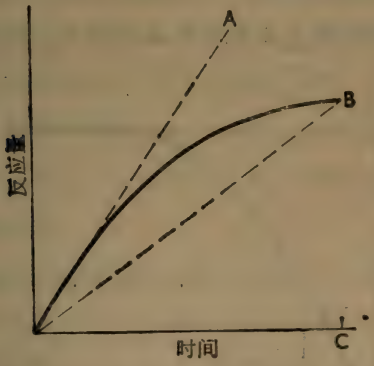


图4-3 酶反应的时间曲线，显示了开始和最后速率之间的差别。

应正在进行的时间长短成正比。在开始阶段之后，反应的速率开始下降，反应量不再与时间成正比。假定底物存在过量，这种现象就可用酶活力在一段时间以后逐渐丧失来解释。这可能是由于热对酶的三级结构的效应，或是反应形成了某些

产物或副产物而抑制了酶。研究任何酶反应的开始，对于确立在这段时间以后，反应与时间以线性关系相变化的时期是很重要的。这段时间可以短至一分钟，但有些酶能有好几天的时间是线性变化。为了得到有意义的结果应该测量反应的初速度。在图 4-3 中，反应的初速度以 A 线的斜率来表示。然而，如果只根据测定在时间 C 后转化的底物来研究反应，那么由 B 线的斜率给出的表面上的反应速率就相当低了。

4.4 底物浓度

假如在一系列不同的底物浓度下测定一个酶反应的初速率，那么就得到如图 4-4 所示形式的结果。底物浓度低时，速

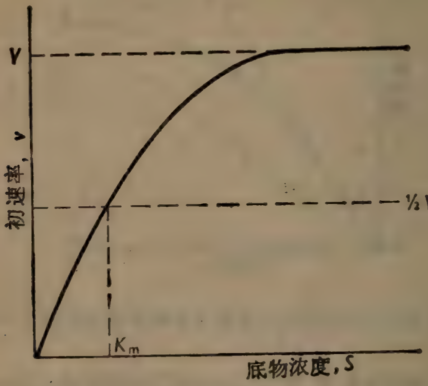


图 4-4 反应速率随底物浓度的变化。各符号的定义见正文。

率与底物浓度成正比，而当底物浓度高时，速率是一常数。这种特性的图解曲线是一个矩形双曲线，其通式为:

$$y = \frac{ax}{x + b} \tag{2}$$

式中 a 是 y 达到的最大值，b 是当 y 为半最大值(即 $y = 1/2\ a$)时的 x 值。在速率随底物浓度而变化的特殊情况下，常数 a 和 b 分别用符号 V 和 K_m 表示，它们在图解上的相互关系见图所示。如果用 v 代表在任何底物浓度 S 时的速率，那么 v 与 S 的关系用方程式表示为:

$$v = \frac{V \cdot S}{K_m + S} \tag{3}$$

这就是所谓的米-曼氏方程（Michaelis-Menten equation)，图 4-4 给出了底物浓度全范围的这一类型的曲线图。V 表示在高底物浓度下反应达到的最大速率，米氏常数 K_m 是当速率为可达到的最大速率的一半时的底物浓度。因此 V 和 K_m 都是通过实验能测得的常数，倘若在控制条件下研究酶，例如在一定的 pH 和温度下，那么对每个特定的酶来说，V 和 K_m 都是特有的和恒定的。

虽然上述米-曼氏方程式是根据实验结果推导出来的，但此方程式也可以通过理论推理而预先得到。不过，必须假定产物与酶再结合成 ES 复合体可以忽略不计，以及底物浓度比酶浓度要大得多。在这种情况下，则

$$V = k_{+1} \cdot E$$

(式中 E 是酶浓度)并且

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

最大速度 V 与酶浓度成正比，如果酶是在底物存在过量时测定的话，那么这样测出的速率就是直接度量存在的酶量。K_m 的确切意义不大好定。它相当依赖于所做假设的有效性，也依赖于在这个公式推导中所采用的简单反应图解的适用性。一般说来，米氏常数最为满意的定义是实验上的那一种，即反应速率与半最大速率相等时的底物浓度。

4.5 V 和 K_m 的测定及其意义

虽然从速率相对底物浓度所作的图直接得到 V 和 K_m 值是可能的，但更常用的却是以速率的倒数 $1/v$ 对底物浓度的倒数 $1/S$ 作图而求得。

重新调整米氏方程得：

$$\frac{1}{v}=\frac{K_m}{V\cdot S}+\frac{1}{V}$$

图 4-5 所示的倒数作图法具有一个 K_m/V 的斜率，在 $1/v$ 轴上的截矩等于 $1/V$，而在 $1/S$ 轴上的则等于 $-1/K_m$。用这个方法能够很方便地得到 K_m 和 V。K_m 的单位与底物浓度的单位一样，通常以克分子浓度表示。V 具有与速率一样的单位，例如每单位时间内被转化的底物的微克分子浓度。这种表示结果的方法就是已知的莱因威弗-伯克作图法。

由于最大速率 V 等于 $k_{+2}\cdot E$，如果在相等酶浓度下比较两个反应的最大速率，那么就可以得到酶-底物复合体分解速率的相对值。

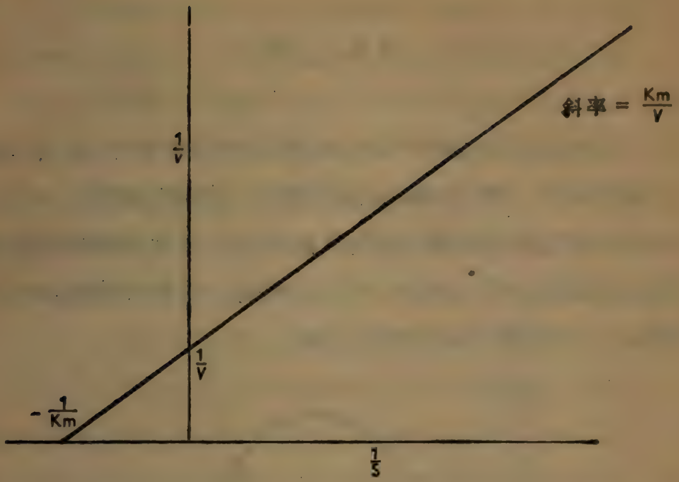


图 4-5 测定 K_m 和 V 的莱因威弗-伯克（Lineweaver-Burk）作图法。

在上述所推导出的反应图解中，假定此设想是有效的，K_m 就等于$(k_{-1}+k_{+2})/k_{+1}$。如果能够证明 ES 复合体分解而形成产物的速率要比它从底物的形成速率慢得多，即 k_{-1} 远大于 k_{+2} 的话，那么 K_m 值大约等于 k_{-1}/k_{+1}，这个值就是复合体 ES 的解离常数，用符号 K_s 表示。K_s 的倒数就是底物与酶的结合力或亲合力的量度。如果这个酶能够和多种相关的底物作用并满足上述的一些准则的话，那么比较每种底物的 K_m 值，就可以得到酶对那些底物相对亲和力大小的一种指标。必须着重指出，如果能够证明 ES 分解速率非常小，那么把 K_m 作为结合常数才是正确的。

4.6 pH

一种酶只是在相对窄的 pH 范围内作为催化剂才有活性，通常是在一特定 pH 时活性最大，此 pH 称最适 pH，图 4-6 所示就是典型的活力对 pH 的作图。对大多数酶来说，此最适 pH 接近中性（pH 5—9），但也有一些例外的酶，如胃蛋白酶，在 pH 值最小时才发生作用。

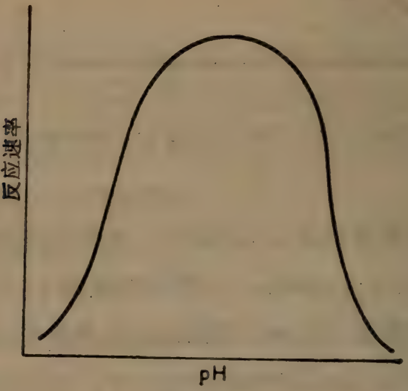


图 4-6 pH 对反应速率的效应。

对这种现象有两种可能的解释。第一种认为偏离了最适点时，酶便不稳定，在这些 pH 值时，酶开始丧失对活性部位构象所必须的三级结构。这个过程(充其量不过是慢可逆的)可使一已知量的酶在偏离其最适 pH 中放一段时间，然后把 pH 迅速调回到最适点，再测定酶活力而试验出来。如果酶活力完全恢复，那么酶在其他 pH 时活力降低的现象就不象是

由于三级结构的改变。在大多数情况下更有可能的解释是，pH 对酶的活性中心上的羧基和碱基的电离作用的效应。

看一下具有一个酸性基团 AH 和碱性基团 B 的酶。此酶可以表示为 HA · R · B。在低 pH 时，酶以 HA · R · BH^+ 形式存在，当 pH增加时，A 基团电离，酶便成为$^-$A · R · BH^+ 的形式。当 pH 进一步增加时，酶就成为$^-$A · R · B 的形式。我们假定只有 A 和 B 基团都带电荷的那种酶，才在催化作用中具有活性。当 AH 出现明显的电离作用时，酶就开始显示活力，当这种电离作用的强度增加时，酶活力也不断增大。最后 AH 实际上将完全电离，酶就显示出其最大的活力。如果 AH 和 BH^+ 的电离作用在它们的 pK 值中非常接近，并达到了最大活力的 pH 的话，BH^+ 基团将开始明显地电离，活力就开始下降。当 pH 增加时，活力将逐渐降低，直到 BH^+ 实际已完全电离时，酶活力就变成零。这个解释方式已广泛应用于研究在活性中心上对酶活力有关的一些基团。特别是如果得到在每一pH值时的 V 值，就可能计算与活性中心的结合基团不同的催化基团的 pK 值。这样除了前面已描述过的鉴定活性中心的化学方法外又提供了一种很有用的工具。

4.7 温度和变性作用

现在来讨论一下 C+D 变成 E+F 的反应。此反应中的能量变化如图 4-7 所示。反应的净结果可能是放出热量(即放热)也可能是吸收热量(即吸热)。但就总的情况来说，在反应

发生前，反应物必须克服称作活化能的“能障”。这种活化能越大，反应就越难发生，而且为了反应成功，必须供给这个系统更多的热量。酶可降低反应的总活化能。酶有这种作用，是由于酶把C和D按一定位置与自身结合以利反应的发生。而非催化的反应是依靠C和D分子之间的随机碰撞，催化反应由于结合作用而使反应机会大大增多了。催化反应所发生的能量

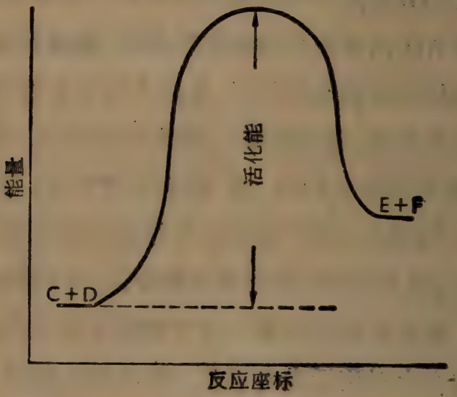


图 4-7 C + D = E + F 反应过程中的能量。

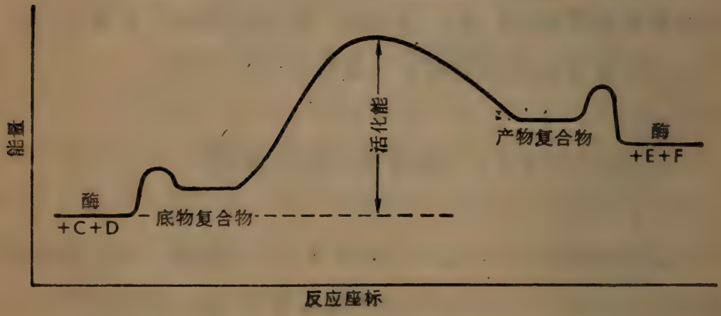


图 4-8 图 4-7 中酶促反应的能量变化。

变化如图 4-8 所示，从图中可以看出，为了形成酶-底物复合体只需要很少的活化能，并且整个反应的活化能大大降低了。

考虑一下温度对一个酶促反应的影响。当温度升高，系统中固有的能量也升高，于是更多的分子获得了发生反应所需要的活化能。因此反应速率随温度升高而增加。如果不考虑其他影响因素的话，这种反应速率随温度升高的增加将会无限制地继续下去。然而当温度升高到高于某一点时，系统中的能量已足够引起氢键及其他各种维持三级结构的力量的破坏，酶便开始丧失它的活力，最终变成完全是无活性的，这个过程就是已熟悉的变性作用。这种情形如图 4-9 所示。在温度低的时候，活力是稳定增加的，但就大多数酶来讲，在 40℃左右，三级结构就开始改变，这就出现一个温度点，在这点上，由于温度对分子的激活作用引起的反应增加，等于由于三级结构的破坏引起的反应速率的降低。在这一温度点上，活力是一极大值，这个温度常被称为最适温度。

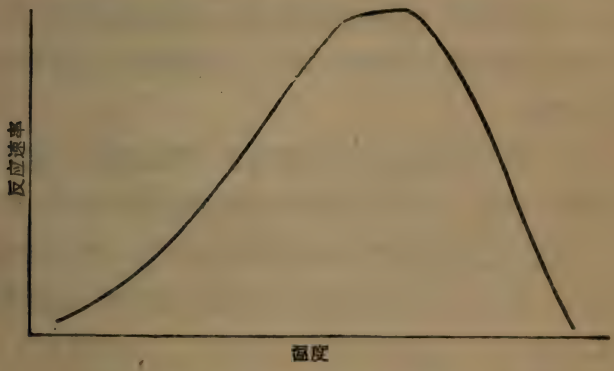


图 4-9　温度对酶促反应速率的影响。

4.8 不可逆和可逆的抑制剂

利用基团专一性试剂，如 PCMB（对氯汞苯甲酸）、DFP（二异丙基氟磷酸）和 FDNB（1-氟-2，4-二硝基苯）就是不可逆抑制作用的例子。一旦试剂与酶形成了共价键，再想除去这个基团恢复酶活力，相对来讲就比较困难了。然而，当使用可逆性抑制剂时，抑制剂很少会与酶共价结合，所以容易利用诸如透析、稀释或加入过量底物等方法除去，以使酶恢复活力。

可逆性抑制剂可以分成两大类：竞争性的和非竞争性的以及别构的。我们将在下一章讨论别构抑制剂。这里集中讨论竞争性的和非竞争性的抑制剂。顾名思义，竞争性抑制剂就是与底物竞争酶分子上的结合部位，估计一种可能是由于竞争性抑制剂与底物有结构上的相似性。而非竞争性抑制剂则是攻击了酶上的催化部位，这样尽管酶仍能与底物结合，却不能发生催化作用（即键转化作用）。从这点可以看出，抑制剂的性质对阐明酶与底物的结合、以及活性中心的催化部位是有帮助的。

实际上区别竞争性和非竞争性最容易的方法，就是在一系列抑制剂浓度下测定反应速率对底物浓度的变化。图 4-10 显示了用竞争性抑制剂得到的标准结果。在各种不同的抑制剂浓度下，当以 $1/v$ 对 $1/S$ 作图时得到一组直线，这些直线在 $1/v$ 轴上相交。此点相当于最大速度 V。这些线在 $1/S$ 轴上交于不同点，因此当存在各种不同浓度的抑制剂时，米氏常

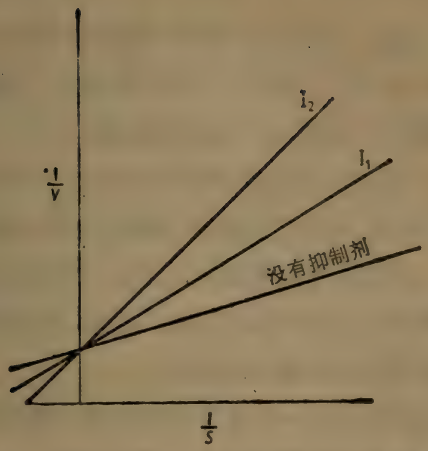


图 4-10　竞争性抑制剂的倒数作图法，显示出在 $1/v$ 轴上的交点。

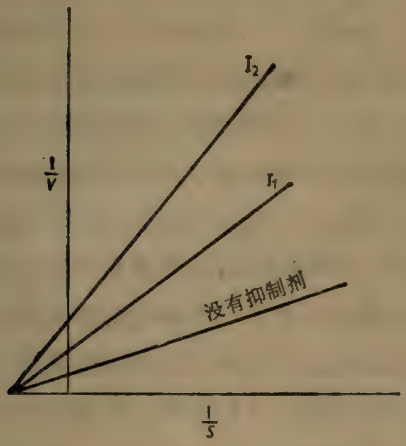
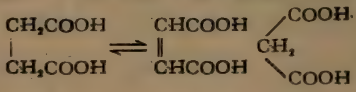


图 4-11　非竞争性抑制剂的倒数作图法，显示出在 $1/S$ 轴上的交点。

数的表观值发生了变化。这些结果可以根据竞争性抑制剂作用的理论来推论，因为竞争性抑制剂影响了底物的结合，因此也就影响了 K_m 值。可是一旦底物被结合，对以后的催化作用就没有影响了，因此对 V 也没有影响。

图 4-11 显示了非竞争性抑制剂类似的结果。各条线在 $1/S$ 轴上相交，每种情况得到了相同的 K_m 值。这点也可以推算出来，因为这种抑制剂并不干扰与底物的结合。抑制剂是通过阻断催化基团而起作用的，因此，在每种情况下 $1/v$ 轴上截距所得到的 V 值各不相同。

竞争性抑制剂的一个典型例子是丙二酸对琥珀酸脱氢酶的效应。此酶催化琥珀酸转化成延胡索酸：



琥珀酸　　　延胡索酸　　　丙二酸

丙二酸的结构与琥珀酸的结构非常相似，因此酶可以很容易地与它结合。然而，从琥珀酸中除去的两个氢在丙二酸中不存在，因此酶便不能催化这个抑制剂的脱氢作用。乙酸既不是抑制剂，又不是这个反应的底物。在生理 pH 下，琥珀酸的两个羧基电离，就整体来看，这些事实提出了在酶上有两个正电荷基团与底物结合有关。竞争性抑制剂特别有用，因为通常它们对特定的酶是专一的。这就可以利用它们来选择性地阻断一些方面的代谢，人们发现许多药物就是在竞争性地抑制了代谢中的关键性酶的基础上而发挥作用的。

氰化物对芳基硫酸酯酶的抑制作用就是非竞争性抑制作

用的一个例子。此抑制剂与底物没有结构上的相似性，是相对地不专一的。已知氰化物可以抑制很多酶，可以证明它是通过与金属离子结合而起作用的，在许多情况下，这些金属离子起着辅基的作用。

5. 酶的分子结构

较详细地讨论了酶的结构和性质以后，再来检查一下目前一些专一的酶的作用机制的理论是恰当的。这就需要依次去考虑酶对各个反应的影响以及酶在代谢的整合和控制中所起的作用。

5.1 酶作用机制

显然，每一种酶促反应各自具有一种与任何其他都不同的作用机制。然而根据我们目前对几种已经详细研究过的酶作用机制的了解，已经开始形成某些基本性的一般观点。这种观点的普遍适用性还是悬而未决而值得揣摩的。

5.1.1 核糖核酸酶

在初步考虑核糖核酸酶的作用机制中（见图 1-3），假定其催化活力是由邻近被水解 RNA 的键的活性基团的准确空间定位而引起的。核糖核酸酶活性中心上的残基包括两个赖氨酸和两个组氨酸。在 pH 接近中性时(这个酶的最适 pH)，赖氨酸带正电荷，用于把 RNA（具有许多带负电荷的已电离的磷酸基团）按正确的定位接上酶。组氨酸是催化基团。组

氨酸的咪唑残基在 pH 5.5 到 7 的范围内电离，实际的 pK 值完全取决于微环境。在图 1-3 中，基团 A 和基团 B 都是组氨酸，在反应开始时 A 大部分电离而 B 没有电离。当形成环磷酸时，基团B失去它的质子，而基团A却从 RNA 获得一个质子。在环磷酸的水解进程中，这个得失质子的过程是逆向的。组氨酸以这种方式作用的能力与这样的事实有关，即它们的 pK 值很接近中性，并且组氨酸在这一 pH 范围内容易具有酸及碱二者的作用。这些系统中咪唑基团的电离状态完全取决于氢离子的局部浓度以及围绕残基的带电荷基团的性质。

目前在研究许多酶的文献中有不少报导，认为这些酶的活性中心有两个组氨酸，并且在这些酶中这种协调的酸-碱作用机制是在运转。这个发现完全不使人感到意外，因为很多有机反应都可以分别被酸和碱所催化，因此可以预期将会证明作用协调的酸和碱的联合作用是一种极有效的催化剂。只需通过固定彼此有关的酸和碱的位置并把将被断裂的键空间定好位、就可以达到蛋白质的这种协调作用。已多次成功地合成低分子量的化合物，在这些化合物中能满足这些准则。这些合成的酶类似物表现出具有催化活力，尽管在多数情况下它们的催化能力比天然的酶要低，然而它们具有活力这一事实是所假设的机制有效性的进一步的证据。

5.1.2 “丝氨酸”蛋白酶类

根据先前对这组酶的活性中心的讨论，证明在各种例子中很可能催化作用的机制都是相似的，并且在这组酶的各个

酶上都具备有显示专一性的酶的结合部位。还发现在所有这一组酶的活性中心上，除了前面提到的丝氨酸外，还含有组氨酸。胰凝乳蛋白酶水解简单酯类的机制与核糖核酸酶水解 RNA 的催化作用极其相似。这再一次证明存在一个协调的酸-碱攻击作用。在核糖核酸酶的情况中，O—P 酯键断裂后，释放的游离酸被内部酯化产生环磷酸。而在被胰凝乳蛋白酶催化的酯的水解作用中，不可能存在这种内酯的结构。在这种情况下，酯键水解释放出来的酸，被酯化到酶的丝氨酸上去，并且作用机制的第二阶段是以相似于环磷酸水解的方式使酯化的酶水解而重新产生自由的酶。因此，核糖核酸酶与胰凝乳蛋白酶在作用机制上的主要区别是，前者是形成内酯的形式，而后者是与酶一起形成酯。

现在相信，各种不同的丝氨酸蛋白酶的专一性不取决于活泼的结合残基，而是取决于结合部位周围的残基。例如，据信在胰凝乳蛋白酶的结合部位附近是一个非极性的碳化氢的裂缝，它能容易地容纳作为胰凝乳蛋白酶专一性需要的一部分芳香族残基。由于这些裂缝的非极性本质，所以不能容纳胰蛋白酶专一性所固有的带电荷的碱性基团，因此胰蛋白酶结合部位周围的残基必定是非常不同的，并且是有助于赖氨酸和精氨酸的。

5.1.3 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

在这个例子中，这个酶的系统名称——甘油醛-3-磷酸：NAD 氧化还原酶提供的情况并不完全，因为虽然这个反应包

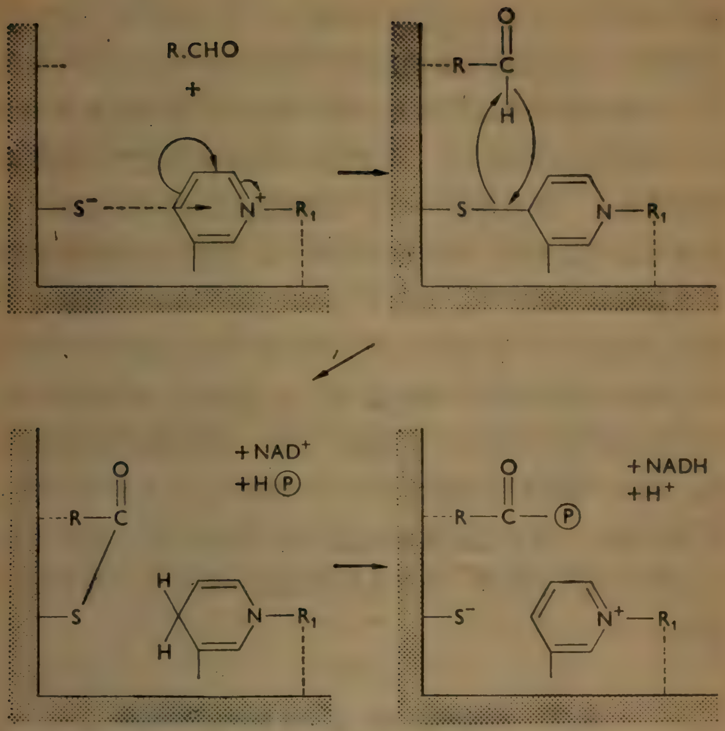


图 5-1 假设的甘油醛-3-磷酸脱氢酶的作用机制。机制的详细解释见正文。为清楚起见，此示意图只包括底物的醛的部分，只用 HⓅ 来代表辅酶的烟酰胺环和磷酸。

括了醛氧化成酸，但没有发现有游离酸，而仅仅发现了它的磷酸酯。总反应是甘油醛-3-磷酸转变成 1,3-二磷酸甘油酸，可用下列方程式表示之:

$$甘油醛\text{-}3\text{-}磷酸 + NAD^+ + 磷酸^- \rightleftharpoons 1,3\text{-}二磷酸甘油酸 + NADH$$

图 5-1 给出了假设的反应机制。离子化的巯基带负电荷，因

此是亲核的。它静电性地接合到基本上是亲电子的 NAD 的烟酰胺环，这是辅酶与酶的结合相当强的原因。此辅酶不能被反复透析或酶的重结晶除去，要完全除去必须用更激烈的方法，如吸附到活性炭上去。甘油醛-3-磷酸是通过它带负电荷的磷酸基团，而与活性中心上半胱氨酸附近的带正电荷的氨基酸残基相结合的。催化作用的第一阶段是把底物上的氢除去并转移到 NAD 上。还原的 NAD（即 NADH）是疏电子的，它释放离子化的巯基，此离子化巯基可自由地接受底物的新形成的酰基而形成一种酰基-酶。反应的第二阶段是酰基-酶被磷酸水解形成 1,3-二磷酸甘油酸，并重新产生游离的酶。然后 NADH 被辅酶库的 NAD 所取代，并且这个过程随时可以重复。这里又象胰凝乳蛋白酶的情况一样，形成了酰基-酶中间体，不过这一次所含的残基是半胱氨酸，而不是丝氨酸。

5.2 四级结构、蛋白质亚单位和别构效应

尽管我们一直把酶结构作为简单的单链蛋白质来考虑，但对许多酶的结构来讲，这种描述是极为简单化的。在甘油醛-3-磷酸脱氢酶的情况中，正常得到的分子量大约为 140,000，在分子中显示有 14—18 个半胱氨酸残基。然而，在 ATP 存在下，这个分子解离成 4 个基本上一样的、分子量为 36,000 的亚单位，并且每个亚单位有 4 个半胱氨酸残基。

每当观察到这种类型的亚单位型式时，通常可发现酶对于底物和其他小分子的调节作用是敏感的，同时当酶被解离成亚单位后，便失去其催化活力。考察一个底物与一个二聚体酶起反应的例子。有两种可能：一种是两个亚单位独立作用，作为两个不同的活性中心而发挥功能；另一种可能是酶与一个部位的结合就可能影响底物与另一部位的结合。通常发现底物与一个亚单位结合可提高另一个亚单位与底物的亲和力，从而促进了与第二个底物分子的结合。这种现象的图解表示法见图 5-2 a。第一个底物分子与亚单位 A 上的楔子相契合，契合以后便诱导亚单位的构象发生变化，使得楔子紧密包围着底物。与亚单位A紧密连结的另一个亚单位也受到这种诱导契合的影响，在这种情况下，楔子被打开，从而允许第二个底物分子较易接近亚单位 B，并促进了它的结合。对作用机制的这种描述是过于简单化了（这种机制称作底物结合的协同作用)，但却可以用来说明所发生的这类现象。

当一些分子在远离酶的活性部位的位点上与酶结合时，整个范围可能都有影响，并且也剧烈地影响那个活性部位的催化活力，这些都归之于别构效应。决不是所有这种结合都会导致提高活力。在有些情况下，一种分子与一个非活性中心的部位结合(称为别构部位)，还可能降低催化活力，已知的这类分子就是别构抑制剂。相反，与别构部位结合也可能导致催化活力的增加，即别构激活作用。图 5-2 b 给出了别构抑制作用的图解。抑制剂分子与别构部位结合，引起亚单位 A 的构象改变，这种改变通过两个亚单位连接到亚单位 B 而

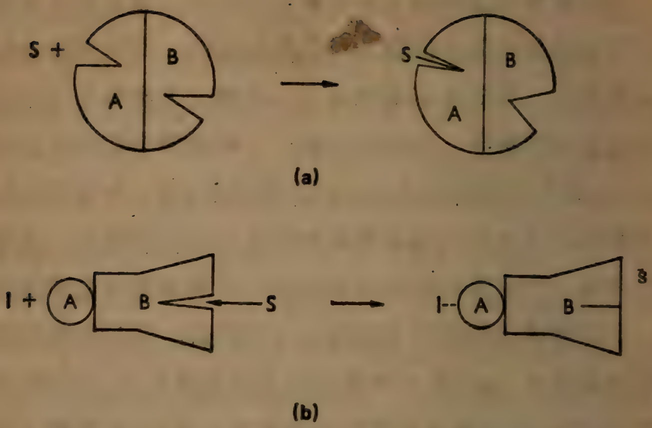


图 5-2 别构效应。(a) 底物结合的协同作用。(b) 别构抑制作用。这种描述纯系图解式的。

得到传送。结果失去了与底物结合的能力，因此抑制[1] 了这个反应。

图 5-2 b 对两个亚单位作了不同的描述。时常发现功能性酶分子(即在细胞中起作用的酶)均由两种类型的亚单位组成。一种亚单位称为催化亚单位，是负责酶的活力的，另一种亚单位称作调节亚单位，是为了提供别构部位，并因此使酶活力可以改变。在某种情况下，解离调节亚单位，重新组合成只含有催化亚单位的酶分子，因此不再受别构控制，这还是有可能的。

就象酶的结合部位具有对底物专一性的情况一样，别构部位与它们的效应物分子的结合时也是专一的。这种专一性

1) 原文 (to catalyse the reaction) 为催化，似有误。——译者注

使酶活力可受到与底物不相似的专一性分子的调节，这种调节作用对于代谢的控制和整合特别重要。这种控制系统的一个重要例子就是磷酸果糖激酶。此酶催化磷酸糖——果糖-6-磷酸按下列方程式进行磷酸化：

果糖-6-磷酸＋ATP→果糖-1,6-二磷酸＋ADP

这个酶基本上是不可逆的，一个单独的果糖-1,6-二磷酸酶催化二磷酸盐水解而成一磷酸。这个反应是位于碳水化合物转化为丙酮酸的途径上，即糖酵解途径，丙酮酸随后被氧化成CO_2并产生大量的以 ATP 形式贮存的能。虽然 ATP 是酶的底物，但在 ATP 浓度比较高时便发生抑制作用，酶则发生解聚作用。有人设想，当 ATP 浓度达到一个临界阈值时，酶就和 ATP 结合形成一个调节部位并发生解聚作用。这样就阻止了催化作用，从而能如此有效地停止了碳水化合物的继续氧化作用。因此也就阻挡了 ATP 的过量贮存，细胞则以碳水化合物的形式保留了它的潜能。酶的别构性质使代谢得到微妙的控制，以致细胞能在任何一点上及时地使养料得到最好的利用，这类例子还很多。

总的来讲，活力受到别构控制的酶可以解聚成无活性的亚单位，它们除了有一活性中心外，还有一别构部位，在它们与底物分子结合中经常显示出协同作用。

5.3 乳糖合成酶

已经描述有些酶当它结合一个亚单位时便会改变结合部

位的专一性，因此反应得以催化。乳酸合成酶就是这类变化的一个新的例子。高尔基复合体的膜上含有一种酶，叫做乙酰乳酸胺合成酶，它催化从一种半乳糖的核苷酸衍生物（即UDP 半乳糖和一种葡萄糖的乙酰化氨基衍生物），即乙酰胺基葡糖合成一种取代二糖——乙酰乳糖胺：

UDP 半乳糖＋乙酰氨基葡糖 $\rightleftharpoons$ 乙酰乳糖胺＋UDP

乙酰乳糖胺合成酶专一性地与一种尚未证明具有任何催化活力的牛乳蛋白质(即乳清蛋白)结合。游离的酶催化产生乙酰乳糖胺的活力要比酶与乳清蛋白的复合体的活力大四倍多。

乙酰乳糖胺合成酶也能在较小的程度上催化二糖本身——乳糖的合成：

UDP 半乳糖＋葡萄糖 $\rightleftharpoons$ 乳糖＋UDP

在催化乳糖的产生中，此酶与乳清蛋白的复合体比游离的酶的效率约大 70 倍。这种转换具有重要的生物学含义。

乙酰乳糖胺合成酶常存在于高尔基体的膜上，负责把糖残基附加到膜上。正常情况下乳清蛋白是不存在的，当乳汁分泌大约要开始时，通过激素作用的媒介，在乳腺内质网的核蛋白体上发生蛋白质合成增加。在产生的各种蛋白质中乳清蛋白从内质网沿着间隙空间送到高尔基体。当遇到乙酰乳糖胺分子时，乳清蛋白分子与它结合，并把酶从产生作为膜的渗入作用的乙酰化氨基糖转换到产生乳糖（乳糖是由乳腺分泌的，是乳汁中的主要糖类）。只是松散地被酶结合的乳清蛋白，也分泌到乳汁中去并产生乳糖，因此乳的产生依赖于乳清蛋白的连续产生，而乳清蛋白则对乳汁的蛋白含量作出贡献。

当乳汁停止产生，与膜仍保持牢固结合的这个酶，在膜的生成过程中，继续发挥它原来的作用。

5.4 反馈抑制作用和代谢的控制

虽然纵贯本书的重点是放在个别酶类的结构和性质上，但最终目的必须是经常了解酶在细胞的新陈代谢中的作用。多数酶是催化一系列有关反应中的一步，至关重要的是这一步不是单个的反应而是一系列反应的总结果。

考虑一下 A→B→C→D→E→F 这一序列，常发现一个反应序列的终末产物抑制负责序列中催化第一步反应的酶。在这个序列中，就是 F 抑制催化 A 转变成 B 的酶。这个现象称为负反馈抑制作用。这里有一个 F 浓度的阈值，浓度低于这个阈值，抑制作用可以忽略不计，但超过这个阈值，抑制作用就逐渐增加。通过这种方式，就能避免 F 的过量产生。

从苏氨酸产生异亮氨酸的反应中观察到一个很好的、有记录的反馈抑制作用的例子。这个反应过程的第一步是苏氨酸被苏氨酸脱氢酶氧化脱氨产生 α-丁酮酸，然后丁酮酸再经过一系列的复杂反应而转变成异亮氨酸：

苏氨酸→α-丁酮酸→→→→→→异亮氨酸

苏氨酸脱氨酶可被高浓度的异亮氨酸专一性地抑制，并且这个抑制作用是别构的。初看起来，可能发现异亮氨酸是作苏氨酸脱氢酶的竞争性抑制剂，因为它的结构与苏氨酸相似。然而其他氨基酸并不抑制这个酶，并且已经证明异亮氨酸的

抑制作用是别构的。由于这种机制，就能避免异亮氨酸的过量产生，而苏氨酸就可以用来合成其他氨基酸。

5.5 代谢的激素控制——糖原的裂解

许多激素通过一种直接和间接的别构效应对关键的代谢酶类施加它们的影响。这方面的一个例子是在对应激或低水平循环血糖作出反应时，分别由激素肾上腺素和胰高血糖素作介导，动员糖的贮备。当身体必需的饮食中的碳水化合物过剩时，就以一种复杂的分支多糖即糖原的形式贮存起来，特别是贮存在肝脏和肌肉中。在应激时，身体对能量的需要增加，这种增加主要靠加快碳水化合物，特别是糖原的氧化作用来满足。应激时分泌的激素是肾上腺素，同样，在更为正常的情况下，需要把血液中循环的葡萄糖水平保持在一定窄的范围之内，如果这个水平下降了，便分泌出胰高血糖素以求提高葡萄糖水平。

糖原磷酸化酶催化糖原分解成葡糖-1-磷酸：

$$\text{糖原}+\text{磷酸} \rightleftharpoons \text{葡糖-1-磷酸}$$

糖原磷酸化酶具有两种形式，“a”形式通常是有活性的，在肌肉中分子量是500,000，“b”形式通常是无活性的，分子量为250,000。两种形式可以互相转化，从b转变成a是由磷酸化酶激酶催化的。这个激酶也存在两种形式，由它的无活性的形式转变成有活性的形式时需要环状AMP，环状AMP是一种从AMP衍生出来的环磷酸，其结构与核糖核酸酶作用

时形成的中间物环磷酸相似。释放至循环中的肾上腺素和胰高血糖素与细胞表面上的专一部位相结合，于是提高了细胞内的环状 AMP 的水平。这样就依次地增加了有活性的激酶的量，后者可增加分解糖原的有活性的磷酸化酶“a”，从而提高了循环的糖的水平。这个系统总结在图 5-3 中。

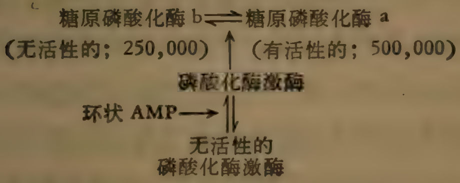


图 5-3 糖原磷酸化酶系统及其激素的控制。

环状 AMP 被类似方式卷入到其他激素控制的系统中，有时被称为第二信使。第一信使激素达到靶细胞，并在靶细胞内释放对某些关键酶具有一种直接的别构效应的环状 AMP。然而，决不是所有的激素影响都是通过环状 AMP 传递的，激素对关键酶具有直接的别构效应的情况也是有的。

5.6 酶的细胞组织机构及多酶系统

在已知的一千多种酶中，可能会发现在任何单个细胞中会有五百多种酶，尽管不完全需要这些酶同时都具有活性。显然，除非在细胞内存在某些组织机构，否则就会发生一片混乱。细胞内含有各种亚细胞颗粒，它们都具有专一的功能，因此都含有专一的酶。例如，线粒体中含有三羧酸循环与电子

传递链所需的各种酶。因此线粒体是细胞内产生能量的主要部位。同样，细胞核含有各种与核酸代谢有关的酶。由于这种区域化，包括在新陈代谢的特殊领域中的各种酶得以聚在一起并保证反应过程的平稳进行。

代谢途径可大略地分成两种类型。第一种类型具有一种分支的反应序列，可导致产生许多种最终产物。许多分解代谢(如降解途径)属于这一类。考虑一下碳水化合物类通过糖酵解途径的氧化作用。这个作用的起始端是散射式的。包括葡萄糖、果糖和糖原在内的各种碳水化合物都可以作为起始物质。通常来说，这个途径将表示出这些物质转变成丙酮酸，因此也就转变成乙酰辅酶 A。在这个途径中有许多分支，以致形成了其他一些必要的细胞组分，如甘油和氨基酸。葡萄糖分子进入代谢途径后的命运完全取决于细胞的代谢状态。如果这个细胞需要能量，它就会转变成丙酮酸；如果这个细胞正在积极地合成蛋白质，它就会转变成氨基酸，如此等等。控制葡萄糖分子代谢路线的是在分支点的酶类的活力，而这些活力继而又受到象反馈抑制作用等这些因素的影响。在这方面说来，由于 ATP 的浓度是细胞的可利用能量的一种标准，所以细胞中 ATP 浓度高时，就会使葡萄糖转变成某种氨基酸。所有的分支途径上的酶都是可溶性的，这样就使底物可以按顺序从一个酶自由移动到另一个酶。相对的酶活力就是在分支点的控制因素。

第二种类型是导致产生专一的终末产物的直链反应序列。在这类情况中常发现代谢途径的各种酶联合组成一种大

的、相对不溶的多酶复合体。脂肪酸生物合成的途径就是一个很好的例子。总过程可以看作是从两个各含有两个碳原子的分子，联接成含有四个碳原子的脂肪酸。这是一种过分的简单化，因为一个 2C 单位转变成 3C 了，然后此 3C 与一个 2C 结合形成一个 5C 分子。此 5C 分子失去二氧化碳就变成 4C 分子，后者分两步还原而形成饱和脂肪酸。这个过程不断重复，直到形成长度适当的链为止。如在图 5-4 中所看到的，此过程包括七个酶，并且从“脂肪酸合成酶”的图解说明里显示，七个酶相应是七个亚单位。如果这些酶按正确次序存在，那么底物分子就可以以一种受控制的、和空间上有利的方式从第一个酶传递到下一个酶。细胞的合成代谢过程常常是属于这一类型。

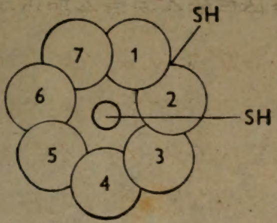


图 5-4　脂肪酸“合成酶”显示了被每一种蛋白质单位所催化的反应的类型。1. 3C 转移到中心 SH 基；2. 2C 转移到周边 SH 基；3.缩合；4.第一次还原作用；5.脱水作用；6.第二次还原作用；7.产物转移到亚单位2。

代谢过程的控制和整合取决于在那些颗粒内个别酶的性质、它们的亚细胞局限性以及各种酶的物理定位。这种极其错综复杂的机构使细胞得以平稳地行使其功能，以及应付许多内部和外部的刺激。

中科院植物所图书馆
S0011921

北京植物所

收到期	1983. 6. 7.
来源	西单新
书价	¥0.48
单据号	0366840
开票日期	83. 6. 7.

23283 58.17435
583

酶的结构和功能. 1983年

借者	借期	借者	借期
吴正华	83.10.12 / 1983.10.13		
李永兴	83.12.14 / 1984.1.7		
于胜敏	90.9.24 / 1990.9.28		

58.17435
583

23283

统一书号：13031·2191
定　价：　0.48 元

本社书号：2997·13-10

科技新书目：43-42